

Biomarker in Atemluft

Qualitätsgesicherte Methodenentwicklung für die Biomarkeridentifizierung zur nicht-invasiven Lungenkrebsdiagnose

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin und
staatlich geprüfter Lebensmittelchemikerin
Kristin Schallschmidt

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Irene Nehls
2. Prof. Dr. Ulrich Panne
- 3.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2017

Meiner Familie

Kurzzusammenfassung

Lungenkrebs ist eine Krankheit mit einer geringen Überlebensrate. Die Prognose verbessert sich bei einer Diagnose im Frühstadium. Bisher gibt es kein geeignetes Screeningverfahren für Risikogruppen. Eine Diagnose auf der Basis von Atemluftanalytik hätte den Vorteil, dass sie für den Patienten nicht-invasiv ist. Ein derartiges Verfahren setzt jedoch die Kenntnis lungenkrebspezifischer Substanzen voraus. Die Identifizierung potentieller Biomarker in der Atemluft für eine Lungenkrebsdiagnose war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Im Fokus stand dabei die qualitätsgesicherte, zuverlässige chemische Analytik auf der Basis einer reproduzierbaren Probenahme.

Ausgehend von einer Literaturrecherche wurde die Gruppe der leichtflüchtigen organischen Substanzen (VOC) als Zielkomponenten ausgewählt. Für die VOC-Analytik kam eine auf der Basis von Festphasenmikroextraktion und anschließende gaschromatographischer Trennung mit massenspektrometrischer Detektion (SPME-GC-MS) entwickelte Methode sowohl in Modellsystemen als auch in Realproben zur Anwendung.

Als Modell für Lungenkrebs wurden die drei Lungenadenokarzinomzelllinien A549, Lu7387 und Lu7466 *in vitro* untersucht. Die VOC-Analyse wurde mit drei verschiedenen Probenahmestrategien durchgeführt: i) direkte Exposition der SPME-Faser in der Zellkulturflasche (quantitative *in-situ*-SPME), ii) Analyse von separierter Kulturflüssigkeit (qualitativ) und iii) Untersuchung einer Gasteilprobe (qualitativ). Bei allen drei Varianten war ein deutlicher Hintergrundeinfluss der eingesetzten Einwegzellkulturflaschen auf das analysierte VOC-Profil feststellbar. Trotz dessen konnten signifikante Unterschiede zwischen Tumorzellen und zellfreien Nährmedien beobachtet werden: 1-Propanol wurde von den Zellen produziert, während der Gehalt einiger Aldehyde sank. Die Eignung dieser Ergebnisse für die Biomarkerableitung ist jedoch als gering einzustufen, weil nur eine eingeschränkte Ähnlichkeit des gewählten Zellkulturmodells mit realen Atemluftproben besteht.

Als Grundlage für die Weiterentwicklung der VOC-Analytik in realen Atemluftproben wurde ein Gasmodell auf Basis angefeuchteter, synthetischer Luft konzipiert. Diese Modellluft wurde mit 24 Zielsubstanzen (Alkane, Aromaten und sauerstoffhaltige Spezies) angereichert, deren Auswahl auf Basis von Screeninguntersuchungen realer Atemluftproben von Patienten sowie Literatur zu potentiellen Biomarkern erfolgte. Zusätzlich wurden drei weitere Matrix-VOC – Isopren, Aceton und 2-Propanol – mit starker Dominanz in den Atemluftproben integriert, um einen gegebenenfalls vorliegenden Einfluss auf die SPME berücksichtigen zu können. Dieses Modell war Grundlage für die qualitätsgesicherte VOC-Analyse der Realproben. Unter anderem wurden damit Nachweisgrenzen im niedrigen $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ -Bereich ermittelt, die in ähnlicher Größenordnung wie Literaturangaben lagen.

Die Gewinnung realer Atemluftproben erfolgte in Kooperation mit zwei Berliner Kliniken. Dafür wurde eine Strategie für eine qualitätsgesicherte Probenahme mit Volumenkontrolle entwickelt. Es erfolgte die Beprobung eines Atemstoßes bestehend aus gemischter Ausatemluft unter Anwendung eines 1 L-Gassammelrohres. Insgesamt konnten 37 Atemluftproben von Lungenkrebspatienten und 23 Proben von Gesunden ausgewertet werden. Für einige der Zielsubstanzen konnte ein Einfluss der Umgebungsluft und des Rauchverhaltens auf das analysierte VOC-Profil statistisch bestätigt werden. Die Anwendung von 1-Butanol als univariater Marker erlaubt eine Erkennung von Lungenkrebs mit einer Sensitivität von 92 % und Spezifität von 78 %. Durch lineare Diskriminanzanalyse mit Leave-One-Out-Kreuzvalidierung konnte ein Set bestehend aus 1-Butanol, 2-Butanon, 2-Pentanon und n-Hexanal ermittelt werden, welches ebenfalls eine Sensitivität von 92 % und mit 87 % eine höhere Spezifität aufwies. Die Ergebnisse lassen jedoch keinen gesicherten Schluss zu, ob es sich bei diesen Biomarkern um spezifische Lungenkrebsmarker oder um allgemeine Krankheitsmarker handelt.

Stichworte: Biomarker, Festphasenmikroextraktion, Gaschromatographie, *in-vitro*-Zellmodell, leichtflüchtige organische Verbindungen, Lungenkrebs

Abstract

Lung cancer is a severe disease with low survival rates. Improved prognoses are achieved with early diagnoses. However, so far no screening method is available which could be applied to high risk groups at regular intervals. A non-invasive breath analysis is likely to cause minor discomfort to patients. Therefore, knowledge on lung cancer specific substances is required. This work aims at the identification of potential biomarkers in breath suitable for lung cancer detection. Thereby, the focus was laid on the quality assurance during sampling and analysis.

An initial literature survey revealed volatile organic compounds (VOC) as promising targets. A method based on solid phase microextraction followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (SPME-GC-MS) was developed to analyse the VOC profiles of model systems as well as real samples.

Firstly, as a model for lung cancer three lung adenocarcinoma cell lines, A549, Lu7387, and Lu7466, were investigated *in-vitro*. The VOC analysis was done using three different strategies, namely i) the direct insertion of the fibre in the culture vessel (quantitative *in-situ*-SPME), ii) the analysis of separated culture medium (qualitative), and iii) the investigation of subsampled headspace (qualitative). Each of these sampling procedures was influenced by the background VOC-profile of the used disposable culture vessels. Besides this, differences between cell lines and cell-free culture media were obvious: 1-propanol was released by the tumour cells whereas the content of several aldehydes was diminished. The similarity of this model system with real breath samples of lung cancer patients was seen to be insignificant. Consequently, these *in-vitro* cultures were not suitable for biomarker identification.

A model consisting of humidified synthetic air was developed as a basis for VOC analysis in breath samples. This model air was fortified with 24 target VOC (alkanes, aromatics and oxygenated species), which were chosen based on a screening of lung cancer patients' breath samples and literature on potential biomarkers. Additionally, three matrix compounds – isoprene, acetone and 2-propanol – dominating patients' VOC profiles in breath were added with respect to a potential influence on SPME extraction efficiency. This gaseous model was used for the quality assured VOC analysis in real breath samples e. g. for the determination of limits of detection, which were found to be in the low ng·L⁻¹ range in accordance with literature data.

The collection of real breath samples was performed in cooperation with two hospitals. For this purpose, a sampling strategy based on thorough quality assurance including the monitoring of the breath volume was developed. Single mixed expiratory breath was taken using a gas bulb with a volume of 1 L. Thirty-seven breath samples from lung cancer patients and 23 from healthy controls were evaluable. A significant influence of the VOC background composition as well as smoking behaviour on the analysed VOC profile in breath was confirmed. Applying 1-butanol as univariate biomarker for classification, a sensitivity of 92 % and a specificity of 78 % were reached. Linear discriminant function analysis with leave-one-out cross validation displayed a set of four VOC (1-butanol, 2-butanone, 2-pentanone, n-hexanal) with a similar sensitivity but a slightly higher specificity of 87 %. However, these potential biomarkers do not have to specifically indicate lung cancer but might rather be a consequence of illness in general.

Keywords: biomarker, gas chromatography, *in-vitro* cell model, lung cancer, solid phase micro extraction, volatile organic compounds

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	i
Abstract	iii
Inhaltsverzeichnis.....	v
Danksagung.....	vii
Selbstständigkeitserklärung.....	ix
Publikationsliste	xi
Abkürzungsverzeichnis	xiii
Abbildungsverzeichnis	xv
Tabellenverzeichnis.....	xxi
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Theoretischer Teil	3
2.1 Biomarker in der Atemluft	3
2.2 Atemluft und Lungenkrebsdiagnose	5
2.3 Atemluftanalytik zur Biomarkeridentifizierung.....	10
2.3.1 Probenahme von Atemluft	10
2.3.2 Analysentechniken zur Untersuchung von Atemluft	11
2.3.3 Statistische Auswertung von Analyseergebnissen zur Biomarkeridentifikation.....	17
2.3.4 Bewertung potentieller Biomarker für die Lungenkrebsdiagnose.....	19
3 Experimenteller Teil.....	21
3.1 HS-SPME-GC-MS-Methodenentwicklung für die VOC-Analytik.....	21
3.2 Modellentwicklung	27
3.2.1 Gasmodell für die Atemluftanalytik auf Basis von Gassammelrohren.....	27
3.2.2 Adsorbervliesgefüllte Probenahmeröhrchen	33
3.3 Untersuchung der VOC-Profile von drei <i>in-vitro</i> -Lungenadenokarzinomzelllinien.....	40
3.3.1 Voruntersuchungen zum Einsatz der SPME-Technik.....	41
3.3.2 Quantitative Analyse des VOC-Profils mit <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS	44
3.3.3 Vergleichende Untersuchung zum Einfluss weiterer Probenahmeverfahren	50
3.4 Untersuchung der VOC-Profile von Realproben	51
3.4.1 Entwicklung einer Strategie zur qualitätsgesicherten Probenahme von Realproben	52
3.4.2 Screeninguntersuchung von Atemluftproben zur Festlegung des Analytspektrums.....	56
3.4.3 Quantitative Analyse von Atemluftproben in Gassammelrohren	57
3.4.4 Qualitative Analyse von Atemluft in adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen.....	59
3.4.5 Qualitative VOC-Analyse von Lungengewebeproben.....	61
4 Ergebnisse und Diskussion.....	63

4.1	VOC-Profile von drei <i>in-vitro</i> -Lungenadenokarzinomzelllinien	63
4.1.1	Leerwert von Zellkulturflaschen	63
4.1.2	Vergleich der quantitativ analysierten VOC-Profile	64
4.1.3	Einfluss verschiedener Probenahmeverfahren auf das VOC-Profil	66
4.1.4	Diskussion der abgeleiteten Biomarkerkandidaten	74
4.2	VOC-Profile von Realproben	74
4.2.1	Screeninguntersuchungen von Atemluftproben in Gassammelrohren	75
4.2.2	Gasmodell und qualitätsgesicherte, quantitative Analyse von Atemluftproben	76
4.2.3	Beschreibung der Studienpopulation und allgemeine Datenvorbehandlung	79
4.2.4	Einfluss des Blindwerts	82
4.2.5	Einfluss des Rauchens	85
4.2.6	Einfluss des Gesundheitszustands und Biomarkeridentifikation	90
4.2.7	Auswertung von zusätzlichen Proben	103
4.3	Vergleich des Zellkulturmodells mit den Realproben	109
4.4	Weitere Ergebnisse	113
5	Zusammenfassung und Ausblick	117
	Literaturverzeichnis	121
	Quellenverzeichnis für Abbildungen	137
A	Anhang	A-1
A.1	Chemikalien und Geräte	A-2
A.2	Ergänzungen zur HS-SPME-GC-MS-Methodenentwicklung	A-6
A.3	Ergänzungen zur Modellentwicklung	A-9
A.4	Ergänzungen zur VOC-Analytik in Zellkulturen	A-20
A.5	Ergänzungen zur Analyse und Auswertung von Realproben	A-41
A.6	Zusammenfassung von Probenahme und Analyse der Atemluftproben	A-72
A.7	Standardarbeitsanweisungen und Erhebungsbögen	A-78

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich bei meiner Promotion unterstützt haben. Besonders danke ich Frau Professorin Dr. Irene Nehls für die herzliche Aufnahme, die interessante Themenstellung, die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die vertrauensvolle Unterstützung. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Ulrich Panne für die Ermöglichung dieses Projektes sowie der unkomplizierten und freundlichen Zusage, die Zweitbegutachtung zu übernehmen.

Herrn Dr. Roland Becker danke ich für die kritische Hinterfragung von Ergebnissen sowie die stets neuen Anregungen. Bei Christian Jung möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und die herzliche Arbeitsatmosphäre im Labor und darüber hinaus bedanken.

Bei den Kollegen des Fachbereiches 1.2 Andreas Buchholz, Ute Dorgerloh, Andrea Hofmann und Annette Ostrowski bedanke ich mich für die vielfältige Unterstützung bei experimentellen und organisatorischen Aufgaben und Problemen. Meinen Bürokollegen und Mit-Doktoranden Dominic Ammann, Caroline Goedecke und Ulrike Mülrow-Stollin gilt mein Dank für die schöne Zeit, die konstruktiven Diskussionen und die Bereitschaft, bei kleinen und großen Problemen zu helfen. Den von mir betreuten Diplomanden Irene Thamm und Kai Halama sowie der Praktikantin Morgane Even danke ich für ihre wertvolle Mitarbeit in verschiedenen Projektteilen.

Ein herzlicher Dank geht an die Mitarbeiter der EPO GmbH Frau Dr. Jana Rolff und Dr. Iduna Fichtner für die Unterstützung und Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Zellkulturen.

Allen Beteiligten der eigenfinanzierten BIOAIR-Studie danke ich für ihre engagierte Arbeit und die Bereitstellung von Ressourcen, ohne die eine erfolgreiche Durchführung des Projektes nicht möglich gewesen wäre: Frau Dr. Gunda Leschber, Dr. Steffen Frese, Dr. Andreas Wilke und Frau Petra Schmutz aus der Evangelischen Lungenklinik Berlin, Dr. Jens Neudecker, Ramona Mette und Miko Schmitt von der Charité Berlin, Herrn Professor Dr. Walles vom Universitätsklinikum Würzburg sowie Herrn Dr. Henry Marc Rübe und Frau Dagmar Borgmann der B.A.D Gesundheitsvorsorge und Sicherheitstechnik GmbH. Darüber hinaus gilt mein Dank allen Probanden für die bereitwillige Teilnahme an dieser Studie.

Dr. Carola Fischer-Tenhagen und Dr. Dorothea Johnen von der Freien Universität Berlin danke ich für die Durchführung des Hundetrainings im Rahmen verschiedener Projekte und der BIOAIR-Studie.

Herrn Professor Dr. Randolph Menzel und seiner Arbeitsgruppe an der Freien Universität Berlin danke ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung beim Bientraining. Herrn Professor Dr. Clemens Mügge von der Humboldtuniversität zu Berlin danke ich für die Möglichkeit, NMR-Spektren aufnehmen zu dürfen.

Darüber hinaus gilt mein Dank weiteren Mitarbeitern der BAM: Herrn Dr. Wolfram Bremser für die Unterstützung im Rahmen der statistischen Berechnungen, Herrn Dr. Dietmar Pfeiffer für die Aufnahme von NMR-Spektren und die wertvolle Hilfe bei der Interpretation, Herrn Dr. Matthias Koch für die Möglichkeit, das UV/VIS-Spektrometer und das LC-MS/MS zu benutzen, Frau Anka Kohl für die IT-Unterstützung, die Aufnahme von ATR-IR-Spektren sowie die Möglichkeit, dass IR-Spektrometer zu benutzen, Carsten Warschat für die Aufnahme und Interpretation von SI-TOF-MS-Spektren, Daniel Werner für die Aufnahme und Interpretation von μ RFA-Spektren, Herrn Dr. Sebastian Recknagel für das Bereitstellen von Räumlichkeiten, Frau Nicole Bierend, Herrn Lutz Richter und Herrn Norbert Beeskow für die Durchführung des Probentransportes zwischen Kliniken und BAM sowie allen anderen Mitarbeitern der BAM für die angenehme Zeit.

Mein innigster Dank gebührt meiner Familie und Freunden für ihre Unterstützung. Insbesondere meinem Partner und meiner Mutter danke ich dafür, dass sie mir während der Anfertigung der Doktorarbeit immer mit Verständnis und moralischer Unterstützung zur Seite standen. Ferner gilt mein Dank allen Korrekturlesern.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 17/2012 am 27.06.2012, angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Kristin Schallschmidt

Berlin, den

Publikationsliste

Publikationen

1. Schallschmidt K., Hofmann A., Jung C., Nehls I. (2014) Alles dicht? Dichtheit von Headspace-Vials für die Gaschromatographie. *GIT Laborfachzeitschrift* 3/2014: 40-43
2. Schallschmidt K., Becker R., Zwaka H., Menzel R., Johnen D., Fischer-Tenhagen C., Rolff J., Nehls I. (2015) In vitro cultured lung cancer cells are not suitable for animal-based breath biomarker detection. *Journal of Breath Research* 9 (2): 027103
3. Schallschmidt K., Becker R., Jung C., Rolff J., Fichtner I., Nehls I. (2015) Investigation of cell culture volatiles using solid phase micro extraction: Options and pitfalls exemplified with adenocarcinoma cell lines. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1006: 158-166

Eingereicht

4. Schallschmidt K., Becker R., Jung C., Bremser W., Walles T., Neudecker J., Leschber G., Frese S., Nehls I. (2016) The comparison of volatile organic compounds from lung cancer patients and healthy controls – challenges and limitations of an observational study. *Journal of Breath Research*, accepted (12.09.2016)
5. Fischer-Tenhagen C., Johnen D., Becker R., Schallschmidt K., Nehls I. (2016) Scent detection by dogs: Development of an odor model and evaluation of two alternative approaches for training and testing. *Chemical Senses*, under revision

Präsentationen

Schallschmidt K., Jung C., Becker R., Leschber G., Frese S., Johnen D., Fischer-Tenhagen C., Neudecker J., Walles T., Nehls I. (2015) BIOAIR: An interdisciplinary project for lung cancer biomarker identification in exhaled breath. *IABR summit 2015*, Wien/ Österreich

Prämierte Poster

Schallschmidt K., Becker R., Menzel R., Johnen D., Fischer-Tenhagen C., Rolff J., Nehls I. (2014) In vitro lung cancer cells are not suitable for breath biomarker search. *Breath Analysis 2014 - 8th International Conference on Breath Research*, Torun/ Polen; 2. Posterpreis

Poster

1. Schallschmidt K., Rolff J., Menzel R., Bartels R., Zwaka H., Nehls I. (2014) Versuch zur olfaktorischen Diskriminierung der Lungenkrebszelllinie A549 durch Honigbienen. 8. *Interdisziplinäres Doktorandenseminar*, Berlin/ Deutschland
2. Schallschmidt K., Becker R., Nehls I. (2014) Volatile biomarkers in the headspace of cultured cells: Comparability of fiber items for headspace solid phase micro extraction (HS-SPME). 8th *Senftenberg Innovation Forum on Multiparametric Analysis*, Senftenberg/ Deutschland
3. Schallschmidt K., Jung C., Becker R., Frese S., Leschber G., Neudecker J., Nehls I. (2015) Erste Ergebnisse zur Untersuchung von Atemluftproben im Rahmen von BIOAIR. 9. *Interdisziplinäres Doktorandenseminar*, Berlin/ Deutschland
4. Halama K., Kaufmann M., Schallschmidt K., Mügge C., Kroh L.W., Becker R., Nehls I. (2015) Charakterisierung flüchtiger Nitrosothiole. 9. *Interdisziplinäres Doktorandenseminar*, Berlin/ Deutschland

5. Schallschmidt K., Becker R., Menzel R., Johnen D., Fischer-Tenhagen C., Rolff J., Nehls I. (2015) Lungenkrebszellkulturen – ein Modell für die Biomarkersuche mit Tiernasen? 2. *Symposium für Odorologie im Diensthundewesen*, Hamburg/ Deutschland
6. Nehls I., Fischer-Tenhagen C., Johnen D., Schallschmidt K., Becker R. (2015) Machbarkeitsstudie zur Evaluierung unterschiedlicher Trainingskonzepte von Hunden. 2. *Symposium für Odorologie im Diensthundewesen*, Hamburg/ Deutschland
7. Becker R., Schallschmidt K., Fischer-Tenhagen C., Johnen D., Nehls I. (2015) Odour reference materials and training concepts of sniffer dogs. *LABR summit 2015*, Wien/ Österreich

Kristin Schallschmidt

Berlin, den

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau
A549	eine Adenokarzinomzelllinie
AC	Adenokarzinom
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
a. u.	arbitrary units (willkürliche Einheiten)
ATR	attenuated total reflection (abgeschwächte Totalreflexion)
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
BIOAIR	Identification of BIO markers in breath by chemical Analys Is and sniffe R dogs in lung cancer patients, Studienbezeichnung
BW	Blindwert
Car/PDMS	Carboxen / Polydimethylsiloxan, eine SPME-Faserbelegung
CI	chemische Ionisation
CPQ	CP PoraBOND Q, eine GC-Kapillarsäule
DHS	dynamic headspace (dynamische Dampfraumanalyse)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium, ein Zellanzuchtmedium
DVB/Car/PDMS	Divinylbenzen / Carboxen / Polydimethylsiloxan, eine SPME-Faserbelegung
EIC	extracted ion chromatogram
ELK	Evangelische Lungenklinik Berlin-Buch
EPO GmbH	Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH
ESR	Elektronenspinresonanz
g	gesunder Studienteilnehmer
GBL	γ -Butyrolakton
GC	Gaschromatographie
GHB	γ -Hydroxybuttersäure
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HP-VOC	eine GC-Kapillarsäule
HS	Headspace (Dampfraum)
ISTD	interner Standard
k	lungenkrebskranker Studienteilnehmer
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
LOD	limit of detection (Nachweisgrenze)
LOO	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung
LOQ	limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
Lu7387, Lu7466	zwei Adenokarzinomzelllinien
MEM	minimum essential medium / modified eagle medium, ein Zellanzuchtmedium
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
n. a.	nicht auswertbar
n. d.	nicht detektierbar
n. e.	nicht erfassbar
n. i.	nicht identifizierbar
NAD	Nicotinsäureamidadeninindinukleotid

NADP	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NIST	National Institute of Standards and Technology (USA)
NM	Nährmedium
NR	Nichtraucher
NSCLC	non-small cell lung cancer (nicht-kleinzelliger Lungenkrebs)
OP	Operation (hier: Eingriff zur Tumorresektion)
<i>p</i> -Wert	probability value (Signifikanzwert)
PA	Polyacrylat, eine SPME-Faserbelegung
PBTP	Polybutylenterephthalat
PDMS	Polydimethylsiloxan, eine SPME-Faserbelegung
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxan / Divinylbenzen, eine SPME-Faserbelegung
PE	Polyethylen
PEC	Plattenepithelkarzinom
PEG	Polyethylenglykol, eine SPME-Faserbelegung
PPS	Polyphenylsiloxan
PTFE	Polytetrafluorethylen
<i>r</i>	Pearson'scher Korrelationskoeffizient
R	aktiver Raucher
rel. LF	relative Luftfeuchte
RPMI-1640	ein Zellanzuchtmedium
RT	Raumtemperatur
SIM	single ion monitoring
SPME	solid phase micro extraction (Festphasenmikroextraktion)
StAA	Standardarbeitsanweisung
<i>t</i>	Zeit
T	Temperatur
TD	Thermodesorption
TIC	total ion current (Totalionenstrom)
US-EPA	United States Environmental Protection Agency
UV-VIS	ultraviolett-visible
VOC	volatile organic compounds (leichtflüchtige organische Substanzen)
VF-624ms	eine GC-Kapillarsäule
ZB-624ms	eine GC-Kapillarsäule
ZKF	Zellkulturflasche

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Zielstellung und Schwerpunkte	2
Abbildung 2:	Zusammensetzung der Atemluft bei Einatmung und Ausatmung ohne Berücksichtigung der Luftfeuchtigkeit nach Angaben in Lang <i>et al.</i> [36].....	3
Abbildung 3:	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalitätsrate für Lungenkrebs in Deutschland 1999-2012 nach Kaatsch <i>et al.</i> [27]	5
Abbildung 4:	Vorgehen bei der Identifizierung von Biomarkern in Atemluft	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Trennung einer Mischung von zwei Analyten in einer GC-Filmkapillarsäule im Trägergasstrom; die roten Moleküle weisen eine stärkere Retention auf und eluieren später als die blauen	12
Abbildung 6:	Modernes GC-MS-System mit Autosampler.....	15
Abbildung 7:	Beispieldarstellung für ein Dendrogramm mit fünf Objekten (A-E), die sich in zwei Cluster (rot, blau) unterteilen lassen; die Objekte A,C und D ähneln sich untereinander, unterscheiden sich jedoch zu B und E	18
Abbildung 8:	Beispieldarstellungen für Ergebnisse einer Diskriminanzanalyse mit 3 Objektgruppen (rot, blau, grün) und zwei kanonischen Variablen.....	19
Abbildung 9:	Reihenfolge des Vorgehens bei den experimentellen Arbeiten.....	21
Abbildung 10:	GC-MS-Chromatogramm eines Standardgemisches mit 40 VOC bei Anwendung des ersten optimierten GC-Ofenprogramms; 28 Substanzen wurden basisliniengetreunt detektiert	22
Abbildung 11:	SPME-Rollrandvial, Feingewindevial, Bördelkappen und Schraubdeckel mit verschiedenen Septenmaterialien.....	24
Abbildung 12:	Vergleich der in den GC-MS-Chromatogrammen ermittelten Signalflächen (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) für 23 VOC von fünf DHS-Adsorbermaterialien (oben) und neun SPME-Fasern (unten)	26
Abbildung 13:	HS-SPME-GC-MS-SIM-Chromatogramm eines Standardgemisches mit 24 Zielsubstanzen bei Anwendung der optimierten Parameter.....	27
Abbildung 14:	HS-SPME-Extraktion in einem Gassammelrohr	28
Abbildung 15:	Einfluss der Extraktionstemperatur auf die ermittelten Signalflächen von n-Aldehyden bei SPME mit Car/PDMS (75 µm) für 15 min mit anschließender GC-MS-Analyse (Mittelwert und Standardabweichung, n=3).....	29
Abbildung 16:	Einfluss der Extraktionszeit auf die ermittelten Signalflächen von n-Aldehyden bei SPME mit Car/PDMS (75 µm) bei 60 °C sowie für 60 min bei Raumtemperatur (RT) mit anschließender GC-MS-Analyse (Mittelwert und Standardabweichung, n=3).....	30
Abbildung 17:	Überprüfung der Stabilität von Standardgemischen mit Zielsubstanzen für die Untersuchung realer Atemluftproben durch Vergleich von 12 Wochen alten Standardlösungen (rot) mit frisch hergestellten (blau) unter Einsatz von SPME-GC-MS	32
Abbildung 18:	Ergebnisse der arbeitstäglichen Untersuchungen eines VOC-Standardgemisches in zwei verschiedenen Konzentrationsniveaus mittels SPME-GC-MS mit einer SPME-Faser für drei VOC (Qualitätskontrollanalysen); die Signalintensität der Injektion Nr. 26 wurde als Bezugspunkt auf 100 % normiert.....	33
Abbildung 19:	Glasrohre mit Adsorbervliesen; 1: Musterexemplar, 2: modifiziertes Gewinderohr, 3: Gewinderohr mit Lochkappe und Septum.....	34

Abbildung 20: HS-SPME-Extraktion in einem Probenahmeröhrchen	35
Abbildung 21: Stanzen von Adsorbervliesen; 1: Stanzgerät, Vliesballen und Aufbewahrungsflaschen, 2: ausgestanztes Vlies, 3: hydrophiles Vlies mit spitzen Ecken, 4: hydrophobes Vlies mit abgerundeten Ecken	35
Abbildung 22: Veränderung des VOC-Profiles in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen bei Raumtemperatur über 24 Wochen; dargestellt ist das Verhältnis der Signalflächen (HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen) der VOC in den gelagerten Proben zu frisch dotierten Vergleichsproben (Mittelwert und Standardabweichung, n=2) in logarithmischer Auftragung; *: nicht alle Datensätze auswertbar aufgrund von Koelution	36
Abbildung 23: HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen zum Einfluss der Equilibrierzeit (1 d) und des Vlieses auf das VOC-Profil in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen; Ausschnitt: Darstellung ohne Matrixsubstanzen	37
Abbildung 24: Veränderung des VOC-Profiles in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon/PTFE-Septen bei Raumtemperatur (rot) oder 6 °C (blau) über 12 Wochen; dargestellt ist das Verhältnis der Signalflächen (HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen) der VOC in den gelagerten Proben zu frisch dotierten Proben (Mittelwert und Standardabweichung, n=2). *: nicht alle Daten auswertbar, Aldehyde C ₈ - C ₁₀ nicht dargestellt, da weitestgehend nicht auswertbar	38
Abbildung 25: Wiederfindung von 19 Ziel-VOC in mit VOC-haltiger Modellluft überspülten Probenahmeröhrchen analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, n=3); blau: Hintergrundbelastung, rot: Probenahmeröhrchen, auf das standarddotierte Modellluft überspült wurde, grün: Probenahmeröhrchen mit direkt dotiertem Standard (Referenz); *: nicht alle Datensätze auswertbar aufgrund von Koelution	39
Abbildung 26: Durchführung der <i>in-situ</i> -SPME in A549-Zellkulturen während des Vorversuches; zum Luftabschluss wurde eine Kunststoffolie in den Deckel der Kulturflasche eingedreht	42
Abbildung 27: <i>In-situ</i> -SPME-GC-MS-Chromatogramm im HS einer A549-Zellkultur	42
Abbildung 28: Septumkappe, entwickelt von TPP GmbH	43
Abbildung 29: Stabilisierung der SPME-Faser in der Zellkulturflasche durch Teflonwerkstück	43
Abbildung 30: Material für den Transport beladener SPME-Fasern	43
Abbildung 31: <i>In-situ</i> -SPME-GC-MS-Chromatogramme von A549-Zellkulturen mit verschiedenen Extraktionszeiten (15, 30, 60 min)	44
Abbildung 32: Einfluss der Reinigungsprozedur auf die Wiederfindung ausgewählter VOC in leeren Zellkulturflaschen, untersucht mit <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, n=3); weiß: unbehandelt, blau: Reinigung durch Spülen mit Methanol und Wasser, rot: Reinigung durch Adsorption an Aktivkohle	45
Abbildung 33: Kalibriergeraden von 1-Butanol und n-Nonanal für den ersten Kalibrierversuch der <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS-Analytik in mit Standard dotierten Zellkulturflaschen mit einer Extraktionszeit von 60 min (rot) und 15 min (blau)	46
Abbildung 34: Vergleichbarkeit von sechs Car/PDMS-Fasern (75 µm) einer Charge bei der Bestimmung ausgewählter VOC mit <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS in mit Standard dotierten Zellkulturflaschen (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)	47

Abbildung 35: Wiederfindungen ausgewählter VOC bei der Lagerung von beladenen SPME-Fasern in verschraubbaren Gläsern auf Trockeneis für verschieden Zeiten von 0 bis 9 h gefolgt von GC-MS-Analyse (Mittelwert und Standardabweichung, n=3).....	48
Abbildung 36: Probenahme der Teilprobe Gas aus Zellkulturen für die HS-SPME-GC-MS-Analyse; 1: Probenahmematerial bestehend aus gasdichter Glasspritze, Kanüle, partiell evakuiertem Vial und Zellkulturflasche mit Septumkappe, 2: Entnahme von 15 mL Luft aus der Zellkulturflasche, 3: Befüllen des partiell evakuierten Vials mit 15 mL Luft aus dem Luftraum der Zellkulturflasche.....	51
Abbildung 37: Applikation von Zellkulturluft in Probenahmeröhrchen	51
Abbildung 38: Wiederfindung von Isopren in fünf nacheinander mit einem Atemzug beatmeten Probenahmeröhrchen analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, n=2); die Signalfläche des ersten Atemzugs wurde auf 100 % gesetzt, mit zunehmender Probennummer ist eine Reduktion der Signalintensität zu beobachten.....	53
Abbildung 39: Veränderung des Isoprensignals in Abhängigkeit der Wartezeit (5-10 min) zwischen aufeinanderfolgenden Atemluftprobenahmen analysiert mit HS-SPME-GC-MS im Probenahmeröhrchen; unterschiedliche Signalintensitäten zum Zeitpunkt t=0 resultieren aus der Durchführung an verschiedenen Tagen.....	53
Abbildung 40: Vorbereitetes Equipment für die Probenahme von Atemluft von Studienteilnehmern; 1: Gassammelrohr mit Mundstück, 2: adsorbervliesgefülltes Probenahmeröhrchen mit Mundstück und Spirometer.....	54
Abbildung 41: Probenahmekoffer für die BIOAIR-Studie mit zwei adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen, einem Gassammelrohr, Mundstück und Adaptern	55
Abbildung 42: Reseziertes Lungengewebe; 1: unauffälliges Gewebe, 2: Tumorgewebe	61
Abbildung 43: HS-SPME-Extraktion von Lungengewebeproben.....	62
Abbildung 44: <i>In-situ</i> -SPME-GC-MS-Chromatogramm einer leeren Zellkulturflasche zur Ermittlung des VOC-Hintergrundprofils	64
Abbildung 45: Beispiele für Kalibrierfunktionen für die <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS-Analytik in Zellkulturflaschen für n-Pentan und 2-Methyl-2-propanol; R ² : Bestimmtheitsmaß.....	65
Abbildung 46: VOC-Profil der A549-Zellkultur unter Anwendung drei verschiedener HS-SPME-Probenahmeverfahren gefolgt von GC-MS-Analyse.....	70
Abbildung 47: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von A549-Zellkulturen, Vergleich von Teilprobe Gas und Luft appliziert in Probenahmeröhrchen.....	73
Abbildung 48: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm der Atemluftprobe eines Lungenkrebspatienten im Gassammelrohr; neben den intensitätsstarken Signalen von Isopren, Aceton und dem exogenen 2-Propanol konnten einige in der Literatur als Lungenkrebsmarker postulierte VOC identifiziert werden; detektierte Siloxane stammen aus der SPME-Faser	75
Abbildung 49: Vergleich zweier Kalibrierbereiche 1:20 (rot) und 1:70 (blau) für die VOC-Analytik mit HS-SPME-GC-MS in Atemluftproben in Gassammelrohren für 2-Methylpentan, n-Propylbenzen und n-Hexanal	76
Abbildung 50: Einfluss der Lagerung von Gassammelrohren mit angefeuchteter, standarddotierter Modellluft über vier Tage auf die Wiederfindung von 24 Zielsubstanzen (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)	79

Abbildung 51: Ausschnitt aus der Datenmatrix mit den Studiendaten für die statistische Auswertung; für die Zielsubstanz n-Nonan ist eine hohe Anzahl an Fehlzeiten ersichtlich; k: krank, NR: Nichtraucher, R: aktiver Raucher, n. a.: nicht auswertbar (Koelution), n. d.: nicht detektierbar	80
Abbildung 52: Ausgewählte Eigenuntersuchungen (Durchführung A) zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf die Gehalte von 2-Butanon und Cyclohexan in der Atemluft (Atem) für verschiedene Probanden (B, J, S) analysiert mit HS-SPME-GC-MS.....	82
Abbildung 53: Ausgewählte Eigenuntersuchungen (Durchführung B) zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf die Gehalte von 1-Butanol und 2-Methylpentan in der Atemluft (Atem) für verschiedene Probanden (B, J, S) analysiert mit HS-SPME-GC-MS; je eine Blindwertprobe steht im Zusammenhang mit zwei Atemluftproben verschiedener Probanden.....	83
Abbildung 54: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Atemluftproben, die vor und nach dem Rauchen eines Zigarillos genommen wurden; direkt nach dem Rauchen ($t=0$, rot) lassen sich sehr viele zusätzliche Signale, vor allem Aromaten und Heteroaromaten, beobachten.....	86
Abbildung 55: Verlauf des Benzengehalts in Atemluftproben nach Rauchen eines Zigarillos zum Zeitpunkt t (HS-SPME-GC-MS-Analyse in Gassammelrohr); bei Durchführung Nr. 1 erfolgte aufgrund von Softwareproblemen keine Datenaufzeichnung für die Atemluftprobenahme zum Zeitpunkt $t+30$ min.....	86
Abbildung 56: Vergleich des Gehalts von 21 VOC in der Atemluft von allen Rauchern und allen Nichtrauchern analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Median und Interquartilabstand in logarithmischer Auftragung)	87
Abbildung 57: Boxplotdarstellung für die Aromatengehalte in der Atemluft von aktiven Rauchern und Nichtrauchern unter Angabe des p -Werts des Mann-Whitney-U-Tests für den Vergleich aller Nichtraucher ($n=35$) mit allen aktiven Rauchern ($n=25$, oben) sowie für die Untergruppen lungenkrebskranke Nichtraucher und kranke aktive Raucher (unten); g: gesund, k: lungenkrebskrank, n: Anzahl der Atemluftproben	88
Abbildung 58: Vergleich des Gehalts von 21 VOC in der Atemluft von Lungenkrebskranken und Gesunden analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Median und Interquartilabstand in logarithmischer Auftragung)	90
Abbildung 59: Boxplotdarstellung für die Gehalte ausgewählter VOC in der Atemluft von Gesunden und Lungenkrebskranken unter Angabe des p -Werts des Mann-Whitney-U-Tests für den Vergleich aller Gesunden ($n=23$) mit allen Kranken ($n=37$, oben) sowie für die Untergruppen lungenkrebskranke Nichtraucher und gesunde Nichtraucher (unten); NR: Nichtraucher, R: aktiver Raucher, Angabe in Klammern gibt die Anzahl der Atemluftproben an.....	91
Abbildung 60: Einsatz von 1-Butanol als univariater Marker für die Kategorisierung von Atemluftproben; Ausschnitt: durch eine Entscheidungsgrenze bei $2,3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ werden 3 Patienten und 5 Gesunde falsch klassifiziert	92
Abbildung 61: Ein möglicher endogener, aus Literaturangaben (s. Text) zusammengetragener Bildungsweg von 1-Butanol, n-Butanal und 2-Butanon.....	92
Abbildung 62: Korrelationsmatrix für fünf VOC durch Auftragung der autoskalierten, logarithmierten Gehalte.....	99
Abbildung 63: Darstellung der Ergebnisse der linearen Diskriminanzanalyse mit 4 Variablen (Ansatz 3)	101

Abbildung 64:	Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse nach der Ward-Methode mit 4 Variablen (Ansatz 3); die Klammern kennzeichnen die drei Hauptcluster	103
Abbildung 65:	Vergleich der HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Atemluftproben eines Lungenkrebskranken genommen mit Gassammelrohr (A) und mit adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen (B).....	104
Abbildung 66:	Vergleich der Signalfächen der auswertbaren Ziel-VOC bestimmt mit HS-SPME-GC-MS in Atemluftproben von Lungenkrebskranken und Gesunden in Probenahmeröhrchen mit unbeatmeten Probenahmeröhrchen (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes); Normierung erfolgte auf den Mittelwert der Blindwertproben	105
Abbildung 67:	Vergleich der VOC-Profile von Atemluftproben dreier Lungenkrebspatienten in Probenahmeröhrchen (Balken) und Gassammelrohr (Symbole) analysiert mit HS-SPME-GC-MS	106
Abbildung 68:	HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von gesundem Lungengewebe und Tumorgewebe eines Patienten; für γ -Butyrolakton konnte im gesunden Gewebe eine höhere Signalintensität beobachtet werden	108
Abbildung 69:	Vergleich der HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von realer Atemluft eines Gesunden und Gasmodell; A: Atemluftprobe eines Gesunden, B: Gasmodell aus standarddotierter feuchter synthetischer Luft; Siloxane stammen aus der Car/PDMS-Faser	109
Abbildung 70:	Vergleich der HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von realer Atemluft eines Kranken und Zellmodell; A: Atemluftprobe eines Lungenkrebskranken, B: <i>in-situ</i> -SPME der Lungenkrebszelllinie Lu7387, C: Teilprobe Gas der Lungenkrebszelllinie Lu7387; Siloxane stammen aus der Car/PDMS-Faser	111
Abbildung 71:	HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme verschiedener, getrockneter Kräuter.....	114
Abbildung 72:	Veränderung des Signals zweier Aldehyde während der Lagerung einer 6-Kräutermischung mit Kamille bei verschiedenen Temperaturen über 12 Wochen, untersucht mit HS-SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung der ermittelten Signalfächen in der gelagerten Probe bezogen auf den Ausgangswert, n=3).....	114
Anhang Abbildung 1:	Ausführliche Übersichtsgrafik mit Kapitelverweisen.....	A-1
Anhang Abbildung 2:	HS-SPME-GC-MS Chromatogramm von asota® olefin-modifizierten Vliesen (Hintergrundbelastung); Ergänzung zu Kapitel 3.2.2.....	A-15
Anhang Abbildung 3:	HS-SPME-GC-MS-Chromtogramme von gespülten und ungespülten Probenahmeröhrchen mit Vliesen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2.....	A-16
Anhang Abbildung 4:	Veränderung des VOC-Profils in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen bei 6 °C über 24 Wochen; dargestellt ist das Verhältnis der Signalfächen (HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen) der VOC in gelagerten Proben zu frisch dotierten Vergleichsproben (Mittelwert und Standardabweichung, n=2) in logarithmischer Auftragung. *: nicht alle Datensätze auswertbar aufgrund von Koelution; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2	A-17
Anhang Abbildung 5:	Wiederfindung von Ziel-VOC in Gassammelrohren beim Versuch zum Überspülen von Modellluft auf Probenahmeröhrchen untersucht mit HS-SPME-GC-MS (n=1); blau: Blindwert von Modellluft ohne Standard in Gassammelrohr, rot: standarddotierte Modellluft in Gassammelrohr (Referenz), grün: VOC-Rückstand in Gassammelrohr nach dem Überspülen der standarddotierten Modellluft; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2	A-19

Anhang Abbildung 6: Wiederfindung von 16 Ziel-VOC im nachgeschalteten Tenax TA-Röhrchen beim Versuch zum Überspülen von Modellluft auf Probenahmeröhrchen untersucht mit TD-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, n=3); blau: Blindwert von Tenax TA, rot: Tenax TA nach Probenahmeröhrchen, auf das standarddotierte Modellluft gespült wurde (Durchbruch), grün: Überspülen der standarddotierter Modellluft direkt auf Tenax TA (Referenz); Ergänzung zu Kapitel 3.2.2	A-19
Anhang Abbildung 7: <i>In-situ</i> -SPME-GC-MS-Chromatogramme von A549-Zellkulturen an zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungstagen mit einem zusätzlich auftretenden, intensiven Signal bei 41,37 min am ersten Untersuchungstag; Ergänzung zu Kapitel 3.3.1	A-21
Anhang Abbildung 8: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm des ursprünglich in den Glasröhrchen enthaltenen Dichtungsmaterials; Ergänzung zu Kapitel 3.3.1	A-22
Anhang Abbildung 9: GC-MS-Chromatogramme von SPME-Fasern, die für 24 h in Glasröhrchen mit alternativen Dichtungsmaterialien lagerten, im Vergleich zu einer frisch konditionierten Faser (Blindwert); Ergänzung zu Kapitel 3.3.1	A-22
Anhang Abbildung 10: Kalibriergeraden von ausgewählten VOC im Kalibrierversuch für insgesamt 73 VOC der <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS im HS in Zellkulturflaschen mit einer Extraktionszeit von 60 min (rot) und 15 min (blau); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2...	A-28
Anhang Abbildung 11: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Gas-Teilproben aus A549-Zellkulturen mit und ohne Zusatz von methanolischer Standardlösung mit deuterierten VOC; Ergänzung zu Kapitel 3.3.3	A-41
Anhang Abbildung 12: Eigenuntersuchungen zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf das VOC-Profil in der Atemluft (Durchführung A) für verschiedene Probanden (B, J, S); Ergänzung zu Kapitel 4.2.4	A-47
Anhang Abbildung 13: Eigenuntersuchungen zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf das VOC-Profil in der Atemluft (Durchführung B) für verschiedene Probanden (B, J, S); je eine Blindwertprobe steht im Zusammenhang mit zwei Atemluftproben verschiedener Probanden; Ergänzung zu Kapitel 4.2.4	A-48
Anhang Abbildung 14: HS-SPME-GC-CIMS-Chromatogramme von adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen; Ergänzung zu Kapitel 3.4.4	A-52
Anhang Abbildung 15: Vergleich zweier Kalibrierbereiche 1:20 (rot) und 1:70 (blau) für die VOC-Analytik mit HS-SPME-GC-MS in Atemluftproben in Gassammelrohren für 24 Ziel-VOC; Ergänzung zu Kapitel 4.2.2	A-53
Anhang Abbildung 16: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Blindwertproben aus den Atemluftprobenahmeräumen der BAM (schwarz) und der ELK (rot); es ist eine Dominanz der Signale von 1- und 2-Propanol zu beobachten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.4	A-56
Anhang Abbildung 17: Auftragung der mit HS-SPME-GC-MS analysierten VOC-Gehalte in Atemluftproben gegen Blindwertproben; rot: Patienten ELK, grün: Gesunde ELK, blau: Gesunde BAM; Ergänzung zu Kapitel 4.2.4	A-57
Anhang Abbildung 18: Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse nach Ward mit 19 Variablen; k: Lungenkrebskranker, g: Gesunder; Ergänzung zu Kapitel 4.2.6	A-66
Anhang Abbildung 19: Erhebungsbogen für Patienten	A-85
Anhang Abbildung 20: Erhebungsbogen für gesunde Probanden	A-88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Literaturübersicht zur VOC-Analyse von Lungenkrebszellkulturen.....	8
Tabelle 2: Charakterisierung von SPME-Fasern (Zusammenstellung nach [134, 135])	13
Tabelle 3: Anpassung des GC-Ofenprogramms für die VOC-Analytik auf Basis der bestehenden Methode zur Trennung von Aldehyden im Rahmen der ersten Optimierung.....	21
Tabelle 4: Parameter von GC-Methoden mit verschiedenen GC-Säulen für die VOC-Analytik im Rahmen der zweiten Optimierung	23
Tabelle 5: Anzahl basisliniengetrennter, angetrennter und koeluierender VOC bei Anwendung der in Tabelle 4 angegebenen Bedingungen auf Standardgemische mit 76 nativen und fünf deuterierten VOC.....	23
Tabelle 6: Liste der getesteten DHS-Adsorbermaterialien und SPME-Fasern.....	25
Tabelle 7: Zusammenfassung der Parameter der HS-SPME-GC-MS-Methode hervorgegangen aus der zweistufigen Optimierung	26
Tabelle 8: VOC-Gehalt in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in Gassammelrohren mit angefeuchteter, standarddotierter Modellluft für die Kalibrierung.....	31
Tabelle 9: VOC-Gehalt in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in Gassammelrohren mit angefeuchteter, standarddotierter Modellluft für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze	32
Tabelle 10: Literaturübersicht zu Proof-of-Principle-Studien zur Lungenkrebserkennung mit trainierten Hunden.....	34
Tabelle 11: Beschreibung der verwendeten humanen Lungenadenokarzinomzelllinien.....	40
Tabelle 12: Versuchsübersicht für Kapitel 3.3.....	41
Tabelle 13: Tumorart und Einwaage der Gewebeproben von fünf Lungenkrebspatienten	61
Tabelle 14: VOC-Gehalte in $\mu\text{g}\cdot\text{Zellkulturflasche}^{-1}$ von Adenokarzinomzellkulturen bestimmt im HS mit <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS-Analyse.....	67
Tabelle 15: Vergleich des Einflusses von vier HS-SPME-GC-MS-Probenahmestrategien auf die ermittelten Trends in den VOC-Profilen von drei Lungenadenokarzinomzellkulturen.....	71
Tabelle 16: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) von 24 Ziel-VOC bei Bestimmung mit HS-SPME-GC-MS in Gassammelrohren mit standarddotierter, angefeuchteter Modellluft im Vergleich mit Nachweisgrenzen* von publizierten Methoden anderer Arbeitsgruppen	78
Tabelle 17: Charakterisierung der Studienpopulation	80
Tabelle 18: Pearson'sche Korrelationskoeffizienten r für den Zusammenhang zwischen dem VOC-Gehalt in der Atemluft und in der Umgebungsluft in den Studiendaten; $r > 0,5$ lässt auf einen Hintergrundeinfluss auf die Zielsubstanz schließen.....	84
Tabelle 19: Vergleich der bestimmten VOC-Gehalte in Atemluft (Angabe als Spanne) mit ausgewählten Literaturangaben	95
Tabelle 20: Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) mit 19 Analyten mit und ohne Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOO); Angabe der Zuordnungsergebnisse als Anzahl und als prozentualer Anteil; Sensitivität und Spezifität sind hervorgehoben.....	100
Tabelle 21: Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) mit Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOO) für drei verschiedene Sets mit vier bis sieben Analyten; Angabe der Zuordnungsergebnisse als Anzahl und als prozentualer Anteil; Sensitivität und Spezifität sind hervorgehoben.....	101

Tabelle 22: Vergleich der in der Atemluft analysierten Aldehydgehalte in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ von zwei Lungenkrebspatienten vor Behandlungsbeginn und 3 Monate nach der Tumoresektion (Verlaufs-kontrolluntersuchungen)	103
Anhang Tabelle 1: Liste der verwendeten Standardsubstanzen	A-2
Anhang Tabelle 2: Liste der eingesetzten sonstigen Chemikalien	A-4
Anhang Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte	A-4
Anhang Tabelle 4: Liste der Materialien für Probenahme und Probenvorbereitung.....	A-4
Anhang Tabelle 5: Bezugsquellen der Lungenadenokarzinomzelllinien	A-5
Anhang Tabelle 6: Details zu eingesetzter Software.....	A-5
Anhang Tabelle 7: Qualitative Zusammensetzung des Standardgemisches mit 24 VOC in Toluol (A) und des Standardgemisches mit 17 VOC in Methanol (B) für die erste Optimierung der GC-Methode; Ergänzung zu Kapitel 3.1	A-6
Anhang Tabelle 8: GC-MS-Parameter während der ersten Methodenoptimierung; Ergänzung zu Kapitel 3.1.....	A-6
Anhang Tabelle 9: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ für 76 native VOC in methanolischem Standardgemisch für die zweite Optimierung der GC-Bedingungen; Ergänzung zu Kapitel 3.1 ..	A-7
Anhang Tabelle 10: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ für fünf deuterierte VOC in methanolischem Standardgemisch für die zweite Optimierung der GC-Bedingungen; Ergänzung zu Kapitel 3.1.....	A-7
Anhang Tabelle 11: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ für 23 VOC in methanolischen Standardgemischen für die Auswahl einer Anreicherungs-methode; Ergänzung zu Kapitel 3.1	A-8
Anhang Tabelle 12: Konditionierungs- und Desorptionstemperaturen von DHS-Adsorbentmaterialien; Ergänzung zu Kapitel 3.1.....	A-8
Anhang Tabelle 13: Konditionierungsbedingungen, Desorptions- und Bakeout-Temperaturen von SPME-Fasern; Ergänzung zu Kapitel 3.1	A-9
Anhang Tabelle 14: SIM-Parameter für die Untersuchung von Aldehyden in Modellproben in Gassammelrohren zur Optimierung der SPME-Bedingungen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1.....	A-10
Anhang Tabelle 15: Standardgemisch mit sechs Aldehyden in Methanol zur Optimierung der SPME-Extraktionszeit und -temperatur für die Atemluftuntersuchung; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1.....	A-10
Anhang Tabelle 16: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ für 24 Ziel-VOC und drei Matrixsubstanzen in methanolischen Standardgemischen für die Kalibrierung der quantitativen Untersuchung von Atemluftproben in Gassammelrohren; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1.....	A-11
Anhang Tabelle 17: SIM-Parameter für die Untersuchung des VOC-Profiles von Gasmodellproben und Atemluftproben; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1	A-12
Anhang Tabelle 18: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ für 24 Ziel-VOC und drei Matrixsubstanzen in methanolischen Standardlösungen zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1	A-12
Anhang Tabelle 19: Standardgemisch mit fünf deuterierten VOC in Methanol zur Untersuchung des Einflusses der Lagerung auf das VOC-Profil von Gassammelrohren mit standard-dotierter, angefeuchteter Modellluft; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1.....	A-13

Anhang Tabelle 20: SIM-Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Lagerung auf das VOC-Profil von Gassammelrohren mit standarddotierter, angefeuchteter Modellluft; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1.....	A-14
Anhang Tabelle 21: Standardgemisch mit 24 Ziel-VOC in Methanol zur Untersuchung der Adsorptionsfähigkeit der Probenahmeröhrchen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2.....	A-18
Anhang Tabelle 22: Liste der Signale im <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS-Chromatogramm einer A549-Zellkultur mit einer minimalen Signalintensität von 100.000 a. u.; Ergänzung zu Kapitel 3.3.1.....	A-21
Anhang Tabelle 23: Liste der in Zellkulturen untersuchten VOC inklusive Angabe der Retentionszeit und des m/z-Verhältnisses des zur Bestimmung der Signalfäche verwendeten Fragments; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2.....	A-24
Anhang Tabelle 24: Wiederfindungen von VOC in gereinigten Zellkulturflaschen im Vergleich mit unbehandelten Flaschen, Angabe in % in der Form Mittelwert n=3 (Standardabweichung); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2.....	A-25
Anhang Tabelle 25: Konzentrationen in ng·µL ⁻¹ von 73 VOC in methanolischen Standardgemischen für die <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS-Analytik in Zellkulturflaschen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2.....	A-27
Anhang Tabelle 26: Konzentration von 67 VOC in ng·µL ⁻¹ in einem Set von Standardlösungen für die Kalibrierung der <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS-Analytik im HS in Zellkulturflaschen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2.....	A-29
Anhang Tabelle 27: Vergleich von sechs Car/PDMS-Fasern (75 µm) einer Charge bei der Bestimmung von VOC im HS in Zellkulturflaschen mit <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS, Angabe als Signalfächen / counts in der Form Mittelwert n=3 (relative Standardabweichung / %); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2	A-31
Anhang Tabelle 28: Wiederfindungen (%) von VOC bei der Lagerung von beladenen SPME-Fasern in verschraubbaren Gläsern auf Trockeneis für verschiedene Zeiten von 0 bis 9 h, Mittelwert n=3 (Standardabweichung); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2	A-33
Anhang Tabelle 29: Bestimmtheitsmaße für sechs separat kalibrierte SPME-Fasern für die quantitative VOC-Bestimmung mit <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS im HS von Zellkulturen auf Basis einer linearen Funktion oder quadratischen Funktion (?); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2.....	A-35
Anhang Tabelle 30: Kalibrierbereich und Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD und LOQ) für quantitative VOC-Bestimmung mit <i>in-situ</i> -SPME-GC-MS im HS von Zellkulturen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2	A-36
Anhang Tabelle 31: Konzentration in ng·µL ⁻¹ von fünf deuterierten Substanzen in einem methanolischen Standardgemisch zur Einbringung in die Teilprobe Gas aus Lungenadenokarzinomzellkulturen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.3.....	A-41
Anhang Tabelle 32: Probenahmezeitpunkt für die Beatmung von Probenahmeröhrchen mit einem Atemzug mit verschiedenen Wartezeiten zwischen je zwei Proben; Ergänzung zu Kapitel 3.4.1.....	A-42
Anhang Tabelle 33: Ergebnis der wiederholten Probenahme von Atemluft mit dem Gassammelrohr (n=5) gefolgt von quantitativer HS-SPME-GC-MS-Analyse; Ergänzung zu Kapitel 3.4.1.....	A-43

Anhang Tabelle 34: Liste der Signale in den HS-PME-GC-MS-Chromatogrammen aus den Screeninganalysen von Atemluftproben in Gassammelrohren von sechs Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 3.4.2 und 4.2.1	A-45
Anhang Tabelle 35: VOC-Gehalte in der Atemluft in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ nach Rauchen eines Zigarillos zum Zeitpunkt t; Ergänzung zu Kapitel 3.4.3 und 4.2.5	A-49
Anhang Tabelle 36: Liste von Substanzen, die bei Anwendung von HS-SPME-GC-CIMS-Analyse von Probenahmeröhrchen entweder in der Atemluftprobe eines Lungenkrebskranken (k) oder eines Gesunden (g) detektiert wurden; Ergänzung zu Kapitel 3.4.4.....	A-51
Anhang Tabelle 37: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ von 24 Ziel- und drei Matrix-VOC in methanolischem Qualitätskontrollstandard für die HS-SPME-GC-MS-Analyse von reseziertem Lungengewebe; Ergänzung zu Kapitel 3.4.5	A-53
Anhang Tabelle 38: Detaillierte Angaben zur Studienpopulation; Ergänzung zu Kapitel 4.2.3	A-55
Anhang Tabelle 39: Anzahl der Fehldaten für jede Zielsubstanz in insgesamt 60 Atemluftproben und Angabe der verwendeten Stellvertreterwerte; Ergänzung zu Kapitel 4.2.3	A-56
Anhang Tabelle 40: Umrechnung der Gehalte der 24 Ziel-VOC in verschiedene Konzentrationen; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6.....	A-59
Anhang Tabelle 41: Test der in Atemluft analysierten VOC-Gehalte auf Normalverteilung mit fünf verschiedenen Tests für die Gruppen nicht-aktive und aktive Raucher sowie Lungenkrebspatienten und Gesunde ($\alpha = 0,05$); Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6	A-60
Anhang Tabelle 42: Test der in Atemluft analysierten, logarithmierten VOC-Gehalte auf Normalverteilung mit fünf verschiedenen Tests für die Gruppen nicht-aktive und aktive Raucher sowie Lungenkrebspatienten und Gesunde ($\alpha = 0,05$); Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6.....	A-61
Anhang Tabelle 43: Vergleich von in Atemluft analysierten VOC-Gehalten in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für alle Nichtraucher mit allen aktiven Rauchern sowie für alle Lungenkrebspatienten mit allen Gesunden mit dem Mann-Whitney-U-Test; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6	A-62
Anhang Tabelle 44: Kenndaten der in Atemluft analysierten VOC-Gehalte in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in den Untergruppen gesunde Nichtraucher, gesunde aktive Raucher, lungenkrebskranke Nichtraucher und lungenkrebskranke aktive Raucher; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6	A-63
Anhang Tabelle 45: Vergleich von in Atemluft analysierten VOC-Gehalten für gesunde Nichtraucher ($n=19$), gesunde aktive Raucher ($n=4$), lungenkrebskranke Nichtraucher ($n=16$) und lungenkrebskranke aktiven Raucher ($n=21$) mit dem Mann-Whitney-U-Test; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6.....	A-64
Anhang Tabelle 46: Matrix von Pearson'schen Korrelationskoeffizienten für die in Atemluft analysierten VOC-Gehalte für 60 Studienproben (Koeffizienten $>0,50$ weisen auf ein ähnliches Verhalten der zwei Substanzen in den Proben hin); Ergänzung zu Kapitel 4.2.6.....	A-65
Anhang Tabelle 47: Faktoren der linearen Diskriminanzfunktion für ein Modell mit 19 Analyten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.6.....	A-66
Anhang Tabelle 48: Faktoren der linearen Diskriminanzfunktion für drei Modelle mit vier bis sieben Analyten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.6.....	A-66

Anhang Tabelle 49: Vergleich der in Atemluft analysierten VOC-Gehalte in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ von zwei Lungenkrebspatienten vor Behandlungsbeginn und 3 Monate nach der Tumorresektion (Verlaufskontrolluntersuchung); Ergänzung zu Kapitel 4.2.7	A-67
Anhang Tabelle 50: Ergebnisse des Vergleichs der aus den HS-SPME-GC-MS-Chromatogrammen für 18 Zielsubstanzen ermittelten Signalflächen von unbeatmeten Probenahmeröhrchen (n=12) mit Atemluftproben von Lungenkrebspatienten (n=18) und Gesunden (n=23) bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7	A-67
Anhang Tabelle 51: Signalflächen / counts für 24 Zielsubstanzen und γ -Butyrolakton ermittelt aus HS-SPME-GC-MS-Chromatogrammen von reseziertem Lungengewebe und von Qualitätskontrollstandardanalysen; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7	A-68
Anhang Tabelle 52: Vergleich der für 24 Zielsubstanzen und γ -Butyrolakton ermittelten Signalflächen in unauffälligem Gewebe mit Tumorgewebe mit und ohne Korrektur für fünf Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7	A-70
Anhang Tabelle 53: Ergebnis der einfachen ANOVA für den Vergleich der Signalintensitäten von γ -Butyrolakton analysiert in unauffälligem Lungengewebe und Tumorgewebe für fünf Patienten mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7....	A-70
Anhang Tabelle 54: Signalidentifizierung in HS-SPME-GC-MS-Chromatogrammen von Lungengewebeproben für fünf Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7...	A-71
Anhang Tabelle 55: Zusammenfassung der HS-SPME-GC-MS-Bedingungen für die quantitative Analyse von Atemluftproben	A-76

1 Einleitung und Zielstellung

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich die Forschung auf dem Gebiet der Atemluftanalytik sprunghaft entwickelt. Als nicht-invasives Verfahren ist die Probenahme von Atemluft für den Probanden belastungsarm und auch schwer erkrankten Patienten zumutbar. Dieser Aspekt macht Atemluft zu einer idealen Humanprobe nicht nur im Bereich des Biomonitorings [1, 2], sondern auch für die medizinische Diagnostik. Unter klinischen Bedingungen wirkungsvoll einsetzbar wird sie aber erst, wenn ein kausaler Zusammenhang zwischen Krankheit und Atemzusammensetzung nachvollzogen werden kann und spezifische Biomarker ermittelt sind.

Noch bis Mitte des 20. Jahrhunderts diente in Ermangelung anderer Verfahren die olfaktorische Evaluierung des Atemgeruchs der Diagnosestellung. So erschien 1949 ein medizinisches Handbuch, welches das Auftreten von charakteristischem Atemgeruch bei bestimmten Magenenerkrankungen, Lungenenerkrankungen, Nierenerkrankungen, diabetischem Koma und Phosphorvergiftung beschrieb [3].

Die moderne Atemluftanalytik geht auf Pauling *et al.* (1971, [4]) zurück. Auf der Grundlage einer gaschromatographischen Analyse war man in der Lage, bereits 250 verschiedene Substanzen im Atem nachweisen zu können. Seitdem gab es eine Vielzahl an Publikationen zu instrumentell-analytischen Untersuchungen zur Atemluftzusammensetzung, wie die Auswahl [5-22] erahnen lässt. Die Suche nach Biomarkern zur spezifischen Krankheitserkennung war dabei stets ein zentraler Punkt.

Die Atemluftanalytik ist auch heute noch ein hochaktuelles Arbeitsgebiet. So wurde 2006 das weltweit erste Institut für Atemgasanalytik als außeruniversitäre Forschungseinrichtung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften gegründet, das sich im letzten Jahrzehnt zu einem europäischen Zentrum für Atemluftanalytik entwickelte. Aber auch weltweit sind unterschiedliche Forschergruppen außerordentlich aktiv auf diesem Gebiet; sie schlossen sich in der 2005 gegründeten „International Association of Breath Research“ zusammen [23].

Ein Spezialgebiet der Atemluftanalytik ist die Biomarkersuche für die Diagnose von Lungenkrebs [24-26]. Aufgrund der Lokalisation des Tumors in der Lunge scheint eine direkte Beeinflussung der Atemluftzusammensetzung sehr wahrscheinlich. Lungenkrebs ist eine der schwerwiegendsten Tumorerkrankungen mit einer unsicheren Prognose. In Deutschland liegen die 5-Jahres-Überlebensraten unter 20 % [27]. Ein nicht belastendes Screeningverfahren zur regelmäßigen Untersuchung von Risikogruppen (Raucher, Passivraucher [27]) wäre ideal, da die Überlebensrate bei einer Erstdiagnose im Frühstadium gegenüber dem Spätstadium deutlich erhöht ist [28].

Aus der Literatur zur Atemluftanalytik wird deutlich, dass die wenigsten Forschungsgruppen multidisziplinär organisiert sind, obwohl die Atemluftanalytik mit ihren Aspekten aus der analytischen Chemie, der Biochemie und der Medizin ein überaus interdisziplinäres Arbeitsfeld ist. Erforderliche Qualitätssicherungsaspekte bei der Probenahme und der Analytik fanden entweder nicht immer optimale Beachtung oder wurden ganz vernachlässigt; demgegenüber weist ein chemischer Analytiker, dass die Qualitätssicherung von Probenahme und Analytik ein notwendiger, zentraler Aspekt in der instrumentellen Analytik ist. Andererseits haben nur die Mediziner die notwendigen Fähigkeiten und Möglichkeiten, eine Lungenkrebsdiagnose zu stellen. Die Biochemiker wiederum besitzen ein tieferes Verständnis für die chemischen Stoffwechselvorgänge.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche und Identifizierung von möglichen Biomarkern in der Atemluft, die für eine Diagnose von Lungenkrebs genutzt werden könnten. Dabei sollte der Fokus auf der qualitätsgesicherten Probenahme und Analytik von Atemluft liegen und die sich aus einem multidisziplinären Projekt ergebenden Synergien genutzt werden.

In Abbildung 1 sind die wesentlichen Schwerpunkte der Arbeit dargestellt. Als Basis für alle zu planenden Arbeiten sollte zunächst eine ausführliche **Literatur**-Recherche zur Ermittlung des aktuellen Forschungsstands in der Atemluftanalytik im Allgemeinen und im Speziellen in Bezug zur

Lungenkrebsdiagnose durchgeführt werden. Mittels dieser Recherche sollte bestimmt werden, welche der leichtflüchtigen organischen Verbindungen (VOC) in der Atemluft als Biomarkerkandidaten gelten, um in einem **Gasmodell** verschiedene gaschromatographische **Analysenmethoden** zu testen und zu optimieren. Darüber hinaus sollte der aktuelle Kenntnisstand zur Atemluft-**Probenahme** für die Festlegung der Probenahmestrategie genutzt werden. In Anlehnung an Literaturergebnisse sollte weiterhin geprüft werden, ob mit Hilfe von Lungenkrebszellkulturen (**Modellproben**) Biomarker identifiziert werden können und inwiefern diese Ergebnisse mit Untersuchungen in Atemluft vergleichbar sind. Im Hauptteil der Arbeit sollte im Rahmen der BIOAIR-Studie (identification of biomarkers in breath by chemical analysis and sniffer dogs in lung cancer patients) in enger Zusammenarbeit mit zwei Berliner Kliniken die Probenahme von Atemluft von Patienten mit Verdacht auf Lungenkrebs und die qualitätsgesicherte Untersuchung dieser **Realproben** mittels Gaschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) im Labor erfolgen. Zur Auswertung aller Daten sollten unterschiedliche statistische Verfahren eingesetzt werden.

Eine detaillierte Übersichtsgrafik zu dem hier beschriebenen Vorgehen mit Kapitelverweisen findet sich in Anhang Abbildung 1 (Seite A-1).

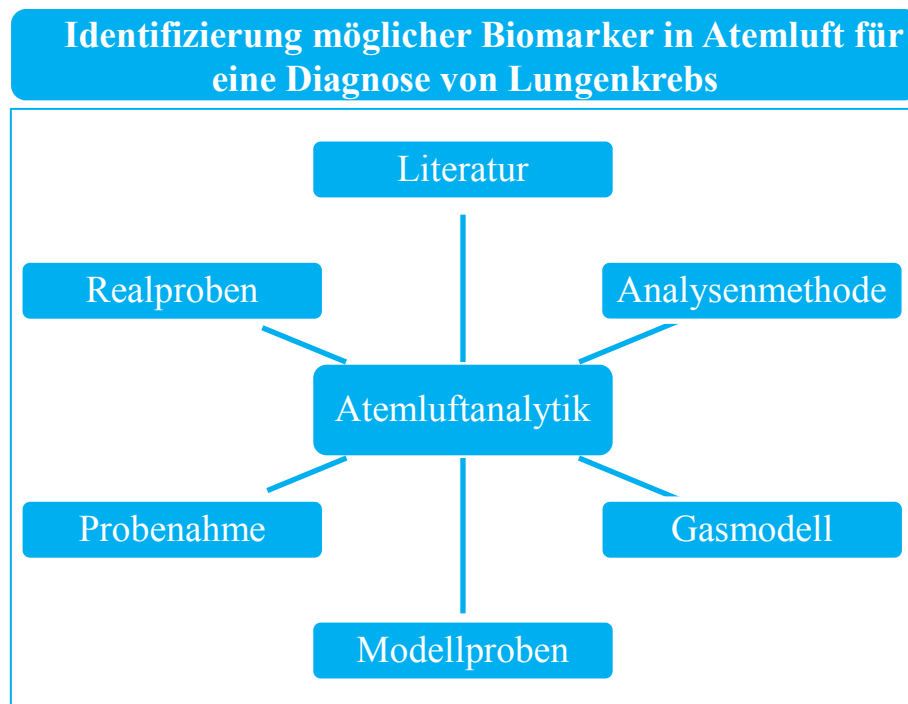


Abbildung 1: Zielstellung und Schwerpunkte

2 Theoretischer Teil

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Biomarker in der Atemluft für die Lungenkrebsdiagnose ermittelt werden. Dafür war zunächst zu klären, was Biomarker sind, was über die Matrix Atemluft bekannt ist, warum gerade Lungenkrebs im Fokus steht und wie man Atemluft untersuchen kann, um potentielle Biomarker zu identifizieren.

2.1 Biomarker in der Atemluft

Biomarker

Der Begriff Biomarker ist eine Verschränkung der Wörter „biologisch“ und „Marker“ [29]. In der Medizin bezeichnet dieser Begriff einen Parameter, der objektiv, akkurat und reproduzierbar analysiert werden kann und Aufschluss über den Zustand eines Organismus gibt; er dient der Diagnose, der Prognose, der Prädiktion oder dem Monitoring [30]. Die zentrale Herausforderung bei der Biomarkersuche ist die Bestimmung des kausalen Zusammenhangs zwischen einem Parameter(set) und einem bestimmten klinischen Zustand [29]. Ein potentielles Feld für die Biomarkersuche ist der Bereich der Metabolomics, da die Stoffwechselvorgänge eines Organismus durch Krankheiten beeinflusst werden und somit Stoffwechselprodukte Indikatoren für physiologische oder pathologische Zustände sein können [31].

Leichtflüchtige organische Verbindungen (VOC) sind ebenso Metaboliten, die auf ihre Eignung als Biomarker für die Erkennung verschiedener Krankheiten hin untersucht werden [32]. Diese sind in verschiedenen Matrices wie Atemluft, Blut, Faeces, Muttermilch, Schweiß, Speichel und Urin [33] beobachtbar. Darunter haben Proben, die durch nicht-invasive Verfahren erhalten werden, den Vorteil, dass sie für den Probanden mit nur geringfügiger Belastung verbunden sind. Die Atemluft ist eine solche Matrix [34]. Ferner erscheint vor allem die Untersuchung der gasförmigen Matrix Atemluft auf VOC intuitiv, weil leichtflüchtige Stoffwechselprodukte mit der Ausatemluft abgegeben werden können.

Zusammensetzung von Atemluft

Atemluft besteht hauptsächlich aus niedermolekularen anorganischen Verbindungen (Abbildung 2). Stickstoff, Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Wasserdampf und Edelgase machen den größten Anteil aus [35]. Im restlichen Anteil von ca. 100 ppm sind weitere anorganische Gase wie Stickoxide, Ammoniak und Wasserstoff enthalten, aber auch eine Vielzahl an VOC, von denen Aceton und Isopren die höchsten Gehalte aufweisen [35].

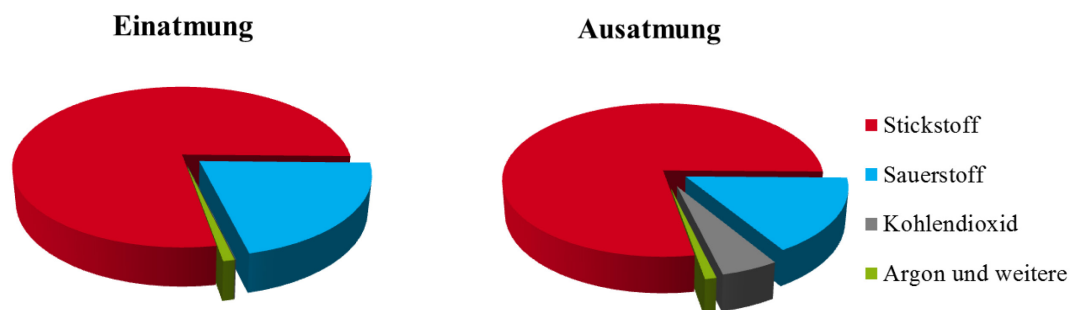


Abbildung 2: Zusammensetzung der Atemluft bei Einatmung und Ausatmung ohne Berücksichtigung der Luftfeuchtigkeit nach Angaben in Lang *et al.* [36]

Beim Atmen findet ein Stoffaustausch statt; in den Alveolen (Lungenbläschen) wird durch passive Diffusion Sauerstoff aus der eingeatmeten Luft aufgenommen und Kohlenstoffdioxid wird aus dem Blut abgegeben [35]. Darüber hinaus unterliegen auch organische Substanzen dem Stoffaustausch. Stoffe mit ausreichend hohem Dampfdruck gehen vom alveolaren Blut in die Gasphase über, während

Substanzen mit ausreichender Löslichkeit aus der Atemluft aufgenommen werden können [35]. Diese verteilen sich anschließend mit dem Blutkreislauf im Körper und können in Gewebe aufgenommen werden. Dadurch kann es zu einer Akkumulation von VOC im Körper kommen [35].

Ein vereinfachter Zusammenhang zwischen dem VOC-Gehalt in der alveolaren Atemluft und im Blut wird durch das Henry-Gesetz beschrieben. Dabei ist der direkt proportionale Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Stoffes in einer Flüssigkeit und in der darüberstehenden Gasphase durch die stoffspezifische Henry-Konstante gegeben [37]. Farhi [38] verfeinerte diesen Zusammenhang mit dem Ventilations-Perfusions-Verhältnis um eine kinetische Komponente. Dieses setzt sich aus dem Herzminutenvolumen zusammen, welches ein Maß für den Stofftransport im Blut darstellt, und der Alveolarventilation, welche den Stofftransport in der Lunge berücksichtigt. King *et al.* [39] entwickelten ein deutlich komplexeres Modell, welches zusätzlich zu den Alveolen und dem alveolaren Blut auch den oberen Respirationstrakt sowie die Leber und weitere Gewebe berücksichtigt.

Die Substanzen in der Atemluft können aus der eingeatmeten Luft stammen, also exogen sein, oder aber aus dem alveolaren Blut kommen [34]. Darüber hinaus kann auch eine Bildung von Stoffen direkt in der Lunge oder im Rachen-, Nasen- und Mundraum stattfinden [34]. All diese Substanzen zusammen ergeben das VOC-Profil der Atemluft. Dieses kann durch physiologische Vorgänge, einschließlich Krankheitsgeschehen, beeinflusst werden [34]. Um jedoch einzelne oder mehrere VOC als Biomarker verwenden zu können, muss eine reproduzierbare, spezifische und kausale Veränderung im VOC-Profil in Abhängigkeit einer Krankheit festgestellt werden [34].

Stand der Forschung

Nachdem Pauling *et al.* 1971 [4] erstmals die Gaschromatographie eingesetzt hatten, um Atemluft systematisch zu untersuchen, hat sich die Atemluftanalytik zu einem wichtigen Arbeitsfeld entwickelt. Weltweit beschäftigen sich Arbeitsgruppen mit der Untersuchung von Atemluft oder assoziierten Proben wie Atemkondensat und Lungengewebe [20, 34, 40-44]. Neben der Suche nach Biomarkern für die Krankheitserkennung ist auch die Expositionsabschätzung zur inhalativen Aufnahme von exogenen, potentiell schädlichen Stoffen ein wichtiges Arbeitsgebiet in der Atemluftanalytik [45]. Es gibt Fachzeitschriften speziell für die Atemluftforschung. Die International Association of Breath Research gibt das „Journal of Breath Research“ heraus und die European Respiratory Society verlegt „Breathe“.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass es sich bei der Atemluftanalytik um ein hoch-aktuelles Arbeitsfeld handelt. Doch trotz vieler Studien in diesem Bereich sind bisher nur wenige Atemtests im klinischen Alltag etabliert. Die am weitesten verbreitete Untersuchung ist die Atemalkoholanalyse [5], die als gleichwertiges Verfahren zur Blutkontrolle in das Straßenverkehrsgesetz (§24a StVG) aufgenommen wurde. Zur Unterstützung der Diagnose von allergischem Asthma wird die Abhängigkeit der endogenen Bildung von Stickstoffmonoxid vom Entzündungszustand der Lunge ausgenutzt [46]. Die Kapnometrie, bei der der Kohlenstoffdioxidgehalt in der Atemluft gemessen wird, ist ein wichtiges Monitoringwerkzeug während Operationen und auf Intensivstationen [35]. Des Weiteren sind Belastungstests in der Anwendung: der ^{13}C -Harnstoffatemtest wird eingesetzt, um eine Besiedelung des Magens mit *H. pylori* [47] nachzuweisen, während mit Wasserstoffatemtests Syndrome des Magen-Darm-Trakts, wie z. B. eine Kohlenhydratmalabsorption, erkannt werden können [48]. Darüber hinaus wurde die Atemluftzusammensetzung im Zusammenhang mit vielen physiologischen Zuständen untersucht, von der hier nur eine kleine Auswahl benannt werden soll: körperliche Betätigung [14, 49], oxidativer Stress [8, 9, 50], Lungenkrebs [11, 13, 16, 18, 51-53], Brustkrebs [10, 19], chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) [7, 54, 55], Tuberkulose [12, 56, 57], Diabetes [58, 59].

In der Diskussion zur Atemluftanalytik sind drei kritische Punkte auszumachen, die einem umfangreicheren Einsatz bisher im Wege standen: die fehlende Standardisierung in der Probenahme [60], die Vielzahl der eingesetzten unterschiedlichen Analyseverfahren [35], und zuletzt vor allem der unbekannte physiologische Hintergrund vieler in der Atemluft beobachteter Substanzen [61].

Diese kritischen Punkte müssen zufriedenstellend gelöst werden, bevor die Atemluftanalytik in einem weitreichenderen Maße zur Diagnostik eingesetzt werden kann. Dabei wäre ein solches nicht-invasives Testverfahren vor allem für die Lungenkrebsdiagnose von höchster Bedeutung.

2.2 Atemluft und Lungenkrebsdiagnose

Im Folgenden soll dargelegt werden, warum ein Diagnoseverfahren für Lungenkrebs auf der Basis einer Atemluftanalytik sinnvoll wäre und welche VOC bisher als potentielle Biomarker für diese Krankheit vorgeschlagen wurden. Darüber hinaus soll gezeigt werden, welches Potential die ergänzende Untersuchung weiterer Matrices für die Biomarkeridentifizierung hat.

Hintergrundinformationen zu Lungenkrebs

Lungenkrebs war 2012 in Deutschland bei Männern mit 34.500 Neuerkrankungen die zweithäufigste Tumorerkrankung und bei Frauen mit 18.000 Fällen die dritthäufigste (Abbildung 3) [27]. Bei den Männern gingen mit 24,8 % die meisten Krebstodesfälle auf Lungenkrebs zurück; bei Frauen war es mit 14,6 % die zweithäufigste Krebstodesursache [27]. Die durchschnittliche absolute 5-Jahres-Überlebensrate lag 2011/2012 bei den Männern bei 14 % und bei den Frauen bei 19 % [27]. Lungenkrebskranke haben damit vergleichsweise schlechte Prognosen. Rauchen ist der Hauptrisikofaktor für Lungenkrebskrankungen und löst bei Männern bis zu 90 % und bei Frauen mindestens 60 % der Lungentumore aus [27]. Weitere Risikofaktoren sind Passivrauchen, Asbest, Radon, Dieselabgase, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Quarz- und Nickelstäube [27]. Ein Zusammenhang von Lungenkrebs mit Feinstaub, genetischer Prädisposition und bestimmten Infektionskrankheiten wird vermutet [27].

Der europaweite wirtschaftliche Schaden, der durch medizinische Versorgung, Arbeitsausfall und verfrühte Todesfälle im Zusammenhang mit Lungenkrebs im Jahr 2009 entstand, wurde auf 18,8 Milliarden Euro geschätzt [62].

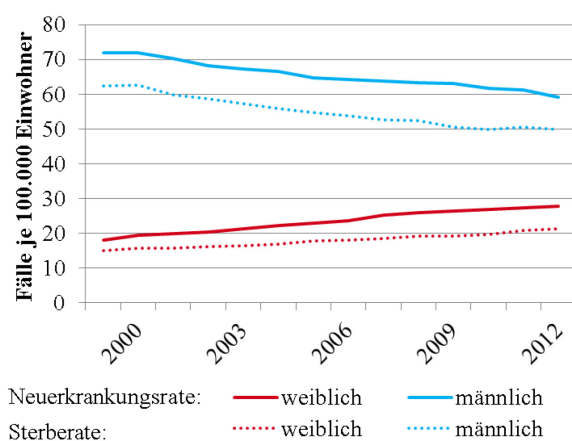


Abbildung 3: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalitätsrate für Lungenkrebs in Deutschland 1999-2012 nach Kaatsch *et al.* [27]

Die Prognose eines Patienten hängt vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ab; die 5-Jahres-Überlebensrate bei einer Diagnosestellung im Frühstadium liegt über 60 %, während eine Diagnose im Spätstadium mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von maximal 5 % einhergeht [28]. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine etablierte Screeningmethode für diese Erkrankung [27]. Deswegen wird Lungenkrebs häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert [63]. Für die Diagnose stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Als die bedeutendsten sind Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Bronchoskopie und molekularbiologische Untersuchung von Tumor-

markern [64] sowie Bildgebung durch Röntgenstrahlung [65] zu nennen. Alle benannten Methoden sind invasiv und eignen sich nicht als Screeningverfahren.

Ideal wäre es, wenn es einen Atemtest für die Erkennung von Lungenkrebs gäbe. Mit diesem nicht-invasiven Verfahren könnten Risikogruppen regelmäßig untersucht werden, um Lungenkrebs-erkrankungen bereits im Frühstadium zu erkennen; anschließend wäre die vorläufige Diagnose mit den oben genannten Verfahren zu verifizieren und so die Überlebenschancen der Patienten zu erhöhen. Voraussetzung dafür ist die Identifizierung von Biomarkern in der Atemluft, die in einem spezifischen, kausalen Zusammenhang mit der Lungenkrebserkrankung stehen.

Potentielle Biomarker in Atemluft für die Lungenkrebsdiagnose

Für die Diagnose von Lungenkrebs auf der Basis von Atemanalysen wurden bereits seit Mitte der 1970er Studien durchgeführt, auf deren Grundlage potentielle Biomarker(sets) postuliert wurden. Eine Auswahl häufig gelisteter Substanzen aus der Gruppe der Alkane, Aromaten und Aldehyde soll im Weiteren vorgestellt werden.

In einigen Studien wurde der Gehalt an unverzweigten und verzweigten Alkanen in der Atemluft im Zusammenhang mit Lungenkrebs diskutiert [66-71]. Die am besten untersuchten Alkane in der Atemluft sind Ethan und n-Pentan. Ihre endogene Bildung wird auf die Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vornehmlich ω 3- und ω 6-Fettsäuren, zurückgeführt [72]. Im Fall von n-Pentan wird zusätzlich auch ein exogener Eintrag angenommen [61]. Die Bildung weiterer Alkane wurde von Kneepkens *et al.* [72] diskutiert; demnach ist eine endogene Bildung ausgewählter Alkane und Alkene bis zu einer Kettenlänge von acht Kohlenstoffatomen plausibel. Ein Erklärungsversuch für die endogene Herkunft methylierter Alkane basiert ebenso auf der Lipidperoxidation von Fettsäuren [73]. Allerdings sind bisher keine verzweigten Fettsäuren als Vorläufermoleküle im menschlichen Organismus bekannt, wodurch diese These als unwahrscheinlich betrachtet werden kann [72]. Plausibler ist die Auffassung, dass die Detektion verzweigter Alkane im Atem auf einen exogenen Eintrag zurückzuführen ist [61, 74]. Hingegen scheint eine Bildung von 2-Methylpropan aus Hämoglobin und die Entstehung von 2-Methylpropen im Rahmen des Leucinabbaus plausibel und die Bildung von Isopren ist im Zusammenhang mit der Cholesterinbiosynthese bekannt [72].

In frühen Studien zum Einfluss von Lungenkrebs auf die Atemluftzusammensetzung wurden Aromaten häufig als potentielle Biomarker diskutiert [6, 68, 69, 71] und in Unkenntnis der Herkunft von Aromaten und Heteroaromaten in der Atemluft auch noch in den frühen 1980er Jahren [75]. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass vorwiegend ein exogener Eintrag vorliegt. Dieser kommt vor allem durch Rauchen zustande, aber auch Passivrauchen und das Einatmen von Verbrennungsabgasen können den Aromatengehalt im Atem erhöhen [61]. Die ursprüngliche Ableitung von Aromaten als Biomarker basiert wahrscheinlich darauf, dass die meist rauchenden Lungenkrebspatienten mit nicht-rauchenden Gesunden verglichen worden waren. Doch auch in neueren Studien wurde beschrieben, dass sich die Gehalte von Aromaten wie Toluol [66] oder Ethylbenzen [76] im Atem signifikant zwischen Lungenkrebskranken und gesunden aktiven Rauchern unterscheiden.

Aliphatische Aldehyde wurden wiederholt mit erhöhten Gehalten im Atem von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden festgestellt [16, 18, 77, 78]. Darüber hinaus wurden auch erhöhte Aldehydgehalte in Urin [79] und Blut [80-82] im Zusammenhang mit Lungenkrebs beobachtet. Eine kausale Verbindung zwischen Lungenkrebs und erhöhten Aldehydgehalten könnte in einer veränderten Aktivität von Aldehyd-Dehydrogenasen [24] bestehen oder auch mit der Lipidperoxidation von ungesättigten Fettsäuren zusammenhängen [34].

Darüber hinaus wurden auch Vertreter anderer Substanzklassen als Biomarker im Atem für Lungenkrebs postuliert, wie Alkohole [76, 78, 83, 84], Ketone [67, 76, 78, 84], Acetoin [83] oder schwefelhaltige Verbindungen [78, 85].

Neben der Untersuchung von Atemluft für die Biomarkeridentifizierung kann auch die Untersuchung anderer Matrices ein vielversprechender Weg sein. Zwei ausgewählte Beispiele, die Analyse von reseziertem Lungengewebe und von Zellkulturen, werden im Weiteren näher vorgestellt.

Weitere Matrices für die Biomarkersuche für Lungenkrebs

Lungenkrebs geht mit der Bildung von entarteten Zellen einher, die im Lungentumor einen Verband bilden. Neben der Untersuchung der Atemluft besitzt auch die direkte Untersuchung von Lungenkrebsgewebe Potential für die Biomarkersuche; man verspricht sich ein tieferes Verständnis für die Herkunft von im Atem beobachteten VOC [20].

Lungentumore werden histologisch in kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC) und in nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC), die sich wiederum in Adenokarzinome (AC), Plattenepithelkarzinome (PEC) und großzellige Karzinome unterteilen lassen, unterschieden [86].

Die Untersuchung von Lungengewebe erfolgt im Zusammenhang mit einer Biopsie oder einer Resektion, die durch den behandelnden Chirurgen in einem Krankenhaus durchgeführt wird. Somit stellt dies eine invasive Methode dar. Die histologische Untersuchung von entnommenem Gewebe durch einen Pathologen dient der Klassifizierung des Tumors [87]. Darüber hinaus gibt es bisher einige wenige Publikationen zu VOC im Dampfraum (Headspace, HS) von kanzerogenem Lungengewebe. Cha *et al.* [88] konnten einen höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren und einen niedrigeren Anteil an ungesättigten Fettsäuren in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe feststellen. Buszewski *et al.* [53] beobachteten erhöhte Gehalte an Alkoholen (Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol), Ketonen (Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon) und schwefelhaltigen Verbindungen in Krebsgewebe. Filipiak *et al.* [20] stellten für Ethanol, Acetaldehyd, n-Oktan, 4-Methylheptan und Pyridin signifikant erhöhte Gehalte in Lungenkrebsgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe fest.

Zellkulturen stellen ein *in-vitro*-Modell für kanzerogenes Lungengewebe dar, die konventionell als zweidimensionales Einschichtsystem in Zellkulturflaschen angezogen werden [89]. Neuere Modelle sind dreidimensional; dabei sind die Zellen in einer extrazellulären Matrix eingebunden, so dass die Mikroumgebung eher den realen Bedingungen in einem Tumor entspricht [90]. Eine Übersicht von Publikationen zum VOC-Profil von Lungenkrebszellkulturen findet sich in Tabelle 1.

Nach den allgemeinen Vorbemerkungen zu potentiellen Biomarkern in der Atemluft zur Lungenkrebsdiagnose folgt eine Betrachtung der Atemluftanalytik und der statistischen Auswertung der Analysenergebnisse.

Tabelle 1: Literaturübersicht zur VOC-Analyse von Lungenkrebszellkulturen

Literatur	Zelllinie	Einfluss der Lungenkrebszellen auf das VOC-Profil im Vergleich zu zellfreiem Nährmedium	weitere Ergebnisse, Kommentare
Smith <i>et al.</i> (2003) [91]	SK-MES (PEC) CALU-1 (PEC)	↑: Acetaldehyd, Essigsäure	Acetaldehydproduktion wird bei Einwirkung eines Cytotoxikums stark reduziert
Shan <i>et al.</i> (2006) [92]	SK-MES (PEC) NCL-H522 (AC)	↓: Acetaldehyd	Lungenkrebszellen verringern auch den Gehalt von zugesetztem Acetaldehyd
Chen <i>et al.</i> (2007) [93]	AC, PEC und andere NSCLC aus reseziertem Gewebe	↑: Isopren, n-Undekan	Analyse des HS der separierten Kulturflüssigkeit mit GC-Flammenionisationsdetektion; Identifizierung erfolgt nur durch Retentionszeitvergleich, diese ist mit hoher Unsicherheit behaftet
Filipiak <i>et al.</i> (2008) [94]	CALU-1 (PEC)	↑: 2,3,3-Trimethylheptan, 2,3,5-Trimethylhexan, 2,4-Dimethylheptan, 4-Methyloktan ↓: Acetaldehyd, Acetonitril, 2-Butanon, n-Butylacetat, Ethyl-t-butylether, Hexanal, 3-Methylbutanal, 2-Methyl-2-butanal, Methyl-t-butylether, 2-Methylpropanal, 2-Methyl-2-propenal, Propenal	
Pyo <i>et al.</i> (2008) [95]	A549 (AC)	-	Einwirkung eines Cytotoxikums führt zur Erhöhung von 2,6-Bis(t-butyl)-2,5-cyclohexadien-1,4-dion, 1,3-Bis(t-butyl)-benzen, n-Nonanal
Barash <i>et al.</i> (2009) [96]	CALU-3, H1650, H4006, H1435, H820, H1975, A549 (AC)	↑: Cyclopropylphenylmethan, (1,1-Dimethylpropyl)-benzen, 4,7-Dimethylundekan, Distickstoffmonoxid, Essigsäure, 3-Ethylbenzaldehyd, Ethylbenzen, 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Ethyl-4-methyl-1-pentanol, 2-(3-Methylbuta-1,3-dienyl)-cyclohexanon, 1-Methyl-3-ethyladamantan, Tricyclo[3.3.2.0(2,8)]deca-3,6-dien, 1,2-Bis-(i-propyl)-benzen, o-Xylen, p-Xylen ↑: 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Methylpentan ↓: Acetaldehyd, n-Butylacetat, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, 2-Methylpropanal	keine Information zur Durchführung der Identifizierung angegeben
Sponring <i>et al.</i> (2009) [97]	NCL-H2087 (AC)	↑: Acetaldehyd	nicht-maligne Lungenkrebszelllinie produziert auch Acetaldehyd
Sule-Suso <i>et al.</i> (2009) [98]	CALU-1 (PEC)		

AC: Adenokarzinom, PEC: Plattenepithelkarzinom, SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom, NSCLC: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; PTR-MS: Protonentransmissions-MS
Anstieg (↑) oder Reduktion (↓) des VOC-Gehaltes durch die Lungenkrebszellen im Vergleich zu zellfreiem Nährmedium

Tabelle 1 (Fortsetzung): Literaturübersicht zur VOC-Analyse von Lungenkrebszellkulturen

Literatur	Zelllinie	Einfluss der Lungenkrebszellen auf das VOC-Profil im Vergleich zu zellfreiem Nährmedium	weitere Ergebnisse, Kommentare
Filipiak <i>et al.</i> (2010) [99]	A549 (AC)	↑: Aceton, 2,4-Dimethyl-1-hepten, Ethanol, Ethyl-t-butylether, Methyl-t-butylether, 2-Methyl-1-penten, n-Okтан, 2-Pentanon, ↓: n-Butylacetat, Ethyl-t-butylether, n-Hexanal, 3-Methylbutanal, Methyl-t-butylether, 2-2-Methyl-2-propenal	
Brunner <i>et al.</i> (2010) [100]	A549 (AC) EPLC (PEC)	↓: Aldehyde (Acetaldehyd, Butanal, Pentanal, Hexanal, Heptanal)	Analyse mit PTR-MS erlaubt nur eingeschränkte Substanzidentifikation
Sponring <i>et al.</i> (2010) [101]	NCI-H1666 (AC)	↓: n-Butylacetat, 2-Ethyl-2-propenal, 3-Methylbutanal, 2-Methyl-2-butenal, 2-Methylpropanal, 2-Methyl-2-propenal, Pyrrol	
Brunner <i>et al.</i> (2011) [102]	A549 (AC)	↓: Acetaldehyd, Essigsäure, Ethanol, Isopren, Methanthiol	ionisierende Strahlung verändert VOC-Profil der Zellkulturen nicht; Analyse mit PTR-MS erlaubt nur eingeschränkte Substanzidentifikation
Barash <i>et al.</i> (2012) [103]	H1650, H820, A549, H1975, H4006, H1435, CALU-3, A549, H2009 (AC) HCC95, HCC15, H226, NE18 (PEC) H774, H69, H187, H526 (SCLC)	Vergleich aller Lungenkrebszelllinien gegen Nährmedium ↑: 1,3-Bis(t-butyl)-benzen 2,4-Bis(t-butyl)-phenol, 6-Methyl-5-hepten-2-on ↓: n-Dekanal, Styren	
Wang <i>et al.</i> (2012) [104]	BEAS-2B (nicht-entartet) A549 (AC) NCI-H446 (SCLC) SK-MES1 (PEC) weitere Zellkulturen aus reseziertem Gewebe	charakteristische VOC für A549: 2,4,6-Trimethylloktan, 2-Methyldodekan, 8-Methylheptadekan, Nonadekan, Eikosan, 2-Tridekanon, 2-Pentadekanon, 2-Heptadekanon; charakteristische VOC für SK MES1: Nonadekan, Eikosan, 2-Nonanon, 2-Pentadekanon, Ameisensäure; charakteristische VOC für NCI-H446: Nonadekan, Eikosan, 1-Heptadekanol, 2-Dekanon, 2-Undekanon, 2-Tridekanon, 2-Pentadekanon 2-Heptadekanon, 2-Methylnaphthalin, 2,6-Dimethylnaphthalin; charakteristische VOC für reseziertes Gewebe: Dekan, Dodekan, Tridekan, Tetradekan, Hexadekan, Nonadekan, Eikosan, Tetradeken, 2-Propyl-1-pentanol, 6-Ethyl-4,5-diol-2,6-dekadien, 2-Pentadekanon	3D-Modell: höhere Acetaldehydproduktion als bei 2D; nicht-maligne Lungenkrebszelllinie produziert auch Acetaldehyd
Rutter <i>et al.</i> (2013) [105]	CALU-1 (PEC)	↑: Acetaldehyd	

AC: Adenokarzinom, PEC: Plattenepithelkarzinom, SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom, NSCLC: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; PTR-MS: Protonentransmissions-MS Anstieg (↑) oder Reduktion (↓) des VOC-Gehaltes durch die Lungenkrebszellen im Vergleich zu zellfreiem Nährmedium

2.3 Atemluftanalytik zur Biomarkeridentifizierung

Es gibt drei große Herausforderungen in der Atemluftanalytik, die bisher eine weitreichende Einführung in den medizinischen Alltag verhindert haben: die Probenahme von Atemluft [60], die Analyse der Atemproben [35] und die fehlende Bestätigung eines kausalen Zusammenhanges zwischen den potentiellen Biomarkern und eines bestimmten physiologischen Zustandes [61]. Auf diese drei Themenbereiche soll im Weiteren detailliert eingegangen werden. Darüber hinaus sollen mögliche Auswertekonzepte diskutiert werden, mit denen aus den Analysenergebnissen potentielle Biomarker abgeleitet werden können. Die wesentlichen Schritte zur Biomarkeridentifizierung sind in Abbildung 4 noch einmal zusammengefasst.

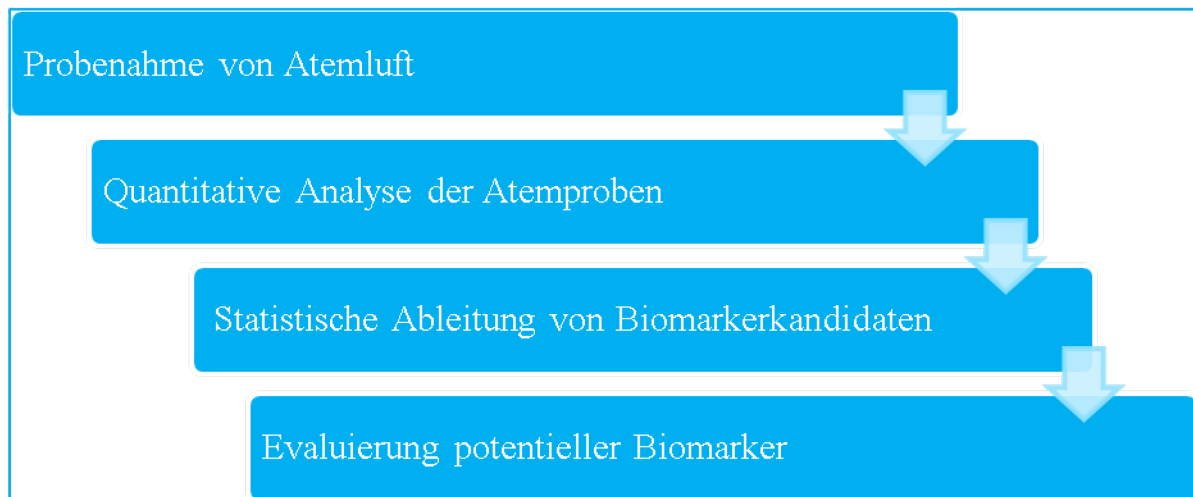


Abbildung 4: Vorgehen bei der Identifizierung von Biomarkern in Atemluft

2.3.1 Probenahme von Atemluft

Bei der Atemluftprobenahme werden mehrere Prinzipien unterschieden. Je nachdem, aus welchen Bereichen der Lunge die Atemluft stammt, wird die Atemprobe als „mixed expiratory breath“ (gemischt expiratorische Atemluft) oder „alveolar breath“ (alveolare Ausatemluft) bezeichnet. Die gemischte expiratorische Atemluft enthält Luft aus dem anatomischen Totraum, dem Übergangsbereich und den Alveolen [106]. Die alveolare Ausatemluft enthält hingegen nur die Luft aus den Lungenbläschen, und die darin enthaltenen VOC-Gehalte stehen im Gleichgewicht mit den VOC-Gehalten im Blut [60]. Darüber hinaus ist auch die Probenahme von Luft nur aus den oberen Bereichen des Respirationstraktes, also ausschließlich aus dem anatomischen Totraum, möglich [107]; diese wird jedoch nur selten beschrieben. Das Kontaminationsrisiko mit exogenen VOC aus der Umgebung ist bei Probenahme von gemischt expiratorischer Atemluft höher als bei der alveolaren Ausatemluft; darüber hinaus ist bei der gemischt-expiratorischen Atemluft eine Verdünnung der Probe durch die Luft des anatomischen Totraums zu beobachten [108]. Damit wird die analytische Zugänglichkeit vieler VOC erschwert, weil die zu erwartenden Konzentrationen im Spurenbereich $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und sogar darunter liegen [108].

Die Anzahl der Atemzüge je Probe stellt ein weiteres Kriterium für die Unterscheidung von Atemluftproben dar. Wird für die Probenahme einer Atemluftprobe nur ein Atemzug verwendet, handelt es sich um eine „single breath“-Probe. Im Vergleich dazu sind bei einer „multiple breath“-Probe mehrere Atemzüge je Probe notwendig [109].

Nachfolgend sind exemplarisch weitere Faktoren aufgeführt, die bei der Atemluftprobenahme in verschiedenen Studien unterschiedlich gehandhabt wurden:

- Beprobtes Atemvolumen: Dieses kann zwischen 10 mL [60] und 20 L [110] betragen.
- Material des Probenahmekörpers: Die am häufigsten eingesetzten Materialien sind Polymerbeutel [66, 76, 111, 112], Glaskörper [16, 60, 113], Stahlgefäße [114, 115] und Adsorberröhrchen [51, 116]. Bei der Auswahl des Probenahmekörpers ist darauf zu achten, dass möglichst wenige Wechselwirkungen, wie z. B. Adsorption oder Migration, zwischen den Substanzen in der Atemprobe und dem Material des Probenahmekörpers stattfinden [117].
- Zeitpunkt der Probenahme: Hierbei sind z. B. Wartezeiten nach der letzten Einnahme von Lebensmitteln oder des letzten Rauchens zu berücksichtigen. Es gibt Studien ohne Vorgabe [53], mit überschaubaren Zeitspannen von 1 h [67] oder auch mit Wartezeiten von mehr als 8 h über Nacht [83]. Dazu gehört auch eine gegebenenfalls einzuhaltende Ruhephase vor der Atemprobenahme, während der keine körperliche Betätigung erfolgen soll. Hierfür werden häufig Zeiten zwischen 5 min [84] und 1 h [66] angegeben.
- Vorgaben zum Atemmanöver: Dabei gibt es die Varianten der normalen Atmung [11, 49, 118] und der forcierten Ausatmung [119, 120]. In einigen Protokollen werden die Probanden dazu aufgefordert, nach dem Einatmen vor der Probenahme für eine definierte Zeit die Luft anzuhalten [106, 121]. Eine weitere Möglichkeit ist die Beprobung von Ausatemluft von mechanisch beatmeten Patienten [108]. In einigen Studien ist das für die Probenahme durchzuführende Atemmanöver nicht exakt beschrieben. Dabei wird vor allem nicht deutlich, ob die Probenahme bei normaler Atmung oder forcierter Ausatmung erfolgte [67, 84, 122-124].
- Zeit zwischen Probenahme und Analyse: Dabei zeichnen sich Online-Messverfahren durch eine Echtzeitanalyse aus [84], während bei den Offline-Methoden unterschiedliche Probenstandzeiten resultieren (1 h [125], 6 h [84], 12 h [123]; eine nähere Betrachtung verschiedener Analysenverfahren befindet sich in Kapitel 2.3.2). Mit einer zunehmenden Standzeit ist das Risiko verbunden, dass sich die Zusammensetzung der Atemluftprobe ändert. Dieses kann durch Reaktionen der in der Probe enthaltenen Substanzen untereinander verursacht werden oder durch Interaktion mit dem Material des Probenahmekörpers [117].
- Weitere Besonderheiten: Dazu gehört z. B. das Auswaschen der Lunge mit VOC-freier Luft vor der Probenahme [126] oder das Einatmen gefilterter Raumluft [71].

Es kann geschlussfolgert werden, dass in der Literatur bisher kein einheitliches Probenahmeprotokoll existiert. Standardverfahren bei der Probenahme sind jedoch eine Voraussetzung für die Vergleichbarkeit von Analysenergebnissen verschiedener Studien [35].

Nach der Probenahme von Atemluft folgt die Analyse der Atemprobe mit einer Vielzahl verschiedener Analysetechniken, die nachfolgend vorgestellt werden sollen.

2.3.2 Analysetechniken zur Untersuchung von Atemluft

In der Atemluftanalytik werden verschiedene analytische Techniken eingesetzt [40]. Dabei kann eine grundlegende Unterscheidung in Online- und Offline-Techniken erfolgen. Die Online-Techniken erlauben eine Echtzeitanalyse („real time“) und können somit eingesetzt werden, um einzelne Atemzüge zu analysieren. Offline-Techniken lassen eine räumliche und zeitliche Trennung von Probenahme und Analyse zu. Diese können mit Anreicherungstechniken kombiniert werden, um die nur in Spuren im Atem enthaltenen VOC anzureichern [40].

Zunächst wird die Gaschromatographie (GC) detailliert vorgestellt. Diese Technik wurde bisher in der Atemluftanalytik am häufigsten eingesetzt [127] und war auch die Methode der Wahl für die vorliegende Arbeit.

Gaschromatographie

Bei der GC werden flüchtige Substanzgemische in einer gasförmigen mobilen Phase (Trägergas) an einer flüssigen oder festen stationären Phase in einer GC-Kapillarsäule entlang geführt. Voraussetzung dafür ist eine ausreichende Flüchtigkeit der Analyten in der Probe. Gegebenenfalls kann diese Vorgabe durch Derivatisierung erreicht werden [128]. Da bei der Atemluftanalyse jedoch eine gasförmige Probe untersucht wird, sind solche Vorbereitungsschritte nicht zwingend notwendig. Bei Vorliegen unterschiedlich starker Retention der verschiedenen Analyten auf oder in der stationären Phase kommt es zur Separation (Abbildung 5) [128]. Neben der Zusammensetzung der stationären Phase und der Länge der Kapillarsäule beeinflussen die Säulentemperatur und die Gasflussrate die Trennung [128]. Im Idealfall verlassen die Analyten die Kapillarsäule mit unterschiedlichen Retentionszeiten, so dass eine vollständige Trennung des Substanzgemisches erreicht wird. Damit können komplexe Gemische, zu denen auch die Atemluft gehört, getrennt werden.

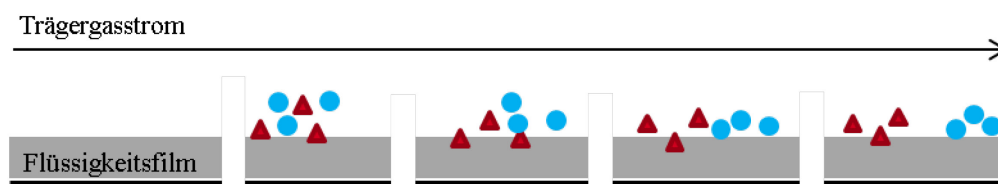


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Trennung einer Mischung von zwei Analyten in einer GC-Filmkapillarsäule im Trägergasstrom; die roten Moleküle weisen eine stärkere Retention auf und eluieren später als die blauen

Häufig wird die GC in der Atemluftanalyse angewendet, da sie eine Trennung der Vielzahl an Substanzen in Atemproben erlaubt [117]. GC-Methoden gelten als robust [107], dauern mit durchschnittlich 30 min relativ lange und erlauben als reine Offline-Technik keine Echtzeitanalyse [107, 117]. Bei Anwendung von GC-Verfahren können der Probenahmeort und der Analysenort voneinander getrennt sein [107]. Nachteilig an der GC ist jedoch, dass thermisch labile Analyten nicht oder nur eingeschränkt zugänglich sind [128].

Die Probenaufgabe in den Gaschromatographen kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Eine direkte Aufgabe von Atemluft mit einer Probenschleife ohne Anreicherungsverfahren wurde z. B. bereits zur Analyse von n-Pentan und Isopren durchgeführt [129]. Deutlich zahlreicher sind jedoch die Anwendungen von Aufgabetechniken mit Probenanreicherung. Auf diese Weise können die nur in Spuren in der Probe enthaltenen VOC konzentriert werden, so dass die Nachweisgrenzen erniedrigt und damit verbessert werden. Dabei ist zu beachten, dass Anreicherungstechniken nie diskriminierungsfrei sind, was für Non-Target-Ansätze problematisch sein kann. Ferner beinhalten solche Probenvorbereitungsschritte das Risiko der Kontamination und des Analytverlustes [34]. Zu Beginn der instrumentell-analytischen Atemluftuntersuchung wurde vor allem die Kryofokussierung eingesetzt [4, 130]. Gegenwärtig haben aber die Headspace-Techniken (HS-Techniken) die größte Bedeutung im Bereich der Atemluftanalytik mit GC [40]. Nachfolgend werden die Festphasenmikroextraktion (SPME), die Anreicherung mit Adsorberröhrchen und die dynamische Headspace (DHS) als Anreicherungstechniken vorgestellt.

Headspace-Techniken zur Anreicherung für die Gaschromatographie

Die Festphasenmikroextraktion (SPME) wurde durch Pawliszyn und Arthur entwickelt [131]. Sie wurde bereits in vielen Studien zur Suche nach Biomarkern in der Atemluft angewendet [66, 67, 69, 70, 76-78, 83, 85, 104, 132, 133]. Bei der HS-SPME wird eine mit Adsorptionsmaterial überzogene Quarzglasfaser in die gasförmige Probe oder in den Gasraum über der flüssigen oder festen Probe eingebracht [128]. Danach erfolgt in Abhängigkeit der Faserbelegung eine Adsorption (Anreicherung an der Faseroberfläche) oder Absorption (Anreicherung in dem Fasermaterial) von flüchtigen Substanzen [128]. Bei dieser statischen Extraktion verteilen sich die Analyten zwischen Probenmatrix, Gasraum, Faseroberfläche und Oberfläche des Probengefäßes entsprechend ihrer Verteilungskoeffizienten [128].

Diese Verteilung wird von der Temperatur beeinflusst [128]. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Extraktionszeit [128]. Bei ausreichend langer Extraktionszeit stellt sich das Verteilungsgleichgewicht vollständig ein [128]. Danach hat eine Erhöhung dieses Parameters keine Konzentrationsänderung in den einzelnen Phasen mehr zur Folge [128]. Wird die Extraktion vor der vollständigen Gleichgewichtseinstellung beendet, können reproduzierbare Ergebnisse nur durch stets gleiche Extraktionszeiten gewährleistet werden, vorausgesetzt die Extraktionstemperatur bleibt ebenso konstant [128]. Nach der Extraktion kann die belegte Faser in den beheizten Injektor des GC-Systems eingebracht werden. Durch Thermodesorption (TD) erfolgt eine Freisetzung der mit der Faser angereicherten Analyten. Diese gelangen in die GC-Kapillarsäule [128]. In Tabelle 2 sind die gegenwärtig kommerziell verfügbaren SPME-Fasern mit ihren empfohlenen Anwendungsbereichen aufgeführt.

Die SPME-Technik zeichnet sich durch eine leichte Handhabbarkeit, den Verzicht auf Lösungsmittel und einen geringen Matriceintrag ins GC-System aus [128]. Der größte Vorteil erwächst jedoch aus der Anreicherung, wodurch auch noch geringe Spuren von flüchtigen Substanzen in der Probe zugänglich werden [128]. Die SPME-Technik weist jedoch auch einige Nachteile auf. Die Empfindlichkeit ist stark substanz- und matrixabhängig, so dass für eine Quantifizierung stets eine substanzspezifische Kalibrierung notwendig ist, die am besten auch matrixspezifisch durchgeführt wird [128]. Da bereits geringe Veränderungen in der Probenzusammensetzung auf die Extraktionseffizienz Einfluss nehmen, empfiehlt sich für die Quantifizierungen der Einsatz eines internen Standards [128]. Außerdem enthält die SPME-Faser nur wenig Adsorber- bzw. Absorbermaterial, so dass der Anreicherungsfaktor im Vergleich zur Extraktion mit Adsorberröhrchen (siehe unten) geringer ist [128]. Außerdem können zu hohe Analytmengen zu einer Überschreitung der begrenzten Kapazität der SPME-Faser führen; in diesem Fall ist eine zunehmende Analytkonzentration nicht mehr mit einem (linearen) Signalanstieg verbunden [128].

Tabelle 2: Charakterisierung von SPME-Fasern (Zusammenstellung nach [134, 135])

Faser-Belegung	Film / μm	Polarität	Prinzip	Anwendungsbereich
PDMS	100	unpolar	Absorption	niedermolekulare, unpolare VOC
	30			unpolare, semi-flüchtige Substanzen
	7			mittel und unpolare, semi-flüchtige Substanzen
CW/DVB	65	polar	Adsorption	polare VOC (Alkohole, Amine)
PA	85	polar	Absorption	polare, semi-flüchtige Substanzen (Phenole)
PDMS/DVB	65	bipolar	Adsorption	polare VOC (Alkohole, Amine)
Car/PDMS	75	bipolar	Absorption, Adsorption	VOC im Spurenbereich
	85			
DVB/Car/PDMS	50/30	bipolar	Absorption, Adsorption	Aromastoffe

PDMS: Polydimethylsiloxan, DVB: Divinylbenzen, PA: Polyacrylat, Car: Carboxen, CW: Carbowax

Die Extraktion mit Adsorberröhrchen wurde ebenso bereits für die Untersuchung von Atemluft eingesetzt [20, 116, 136]. Diese kann passiv oder aktiv erfolgen [128]. Bei der passiven Probenahme wird das lose Adsorbermaterial in die Probenumgebung, z. B. eine Prüfkammer mit Zellkultur [103], eingebracht. Bei der aktiven Probenahme wird das Luftvolumen des Gasraumes einer Probe mittels einer Pumpe durch das Adsorberröhrchen hindurchgesogen. Durch Wechselwirkung der im Gasraum enthaltenen Substanzen mit dem Adsorbermaterial kommt es zur Anreicherung [128]. Die beladenen Adsorberröhrchen können anschließend in einen speziellen beheizten Injektor eingebracht werden; dort erfolgt eine TD der Analyten, gefolgt von einer Kryofokussierung und einer erneuten TD mit direkter Einleitung in das GC-System [128]. Ebenso wie bei der SPME liegt der größte Vorteil bei Anwendung der Adsorberröhrchen in der Anreicherung von Analyten [128]. Darüber hinaus steht mit dieser Technik eine deutlich höhere Kapazität zur Verfügung [128]. Ein Nachteil der Arbeit mit Adsorberröhrchen ist das Risiko der Analytverschleppung in nachfolgende Analysenläufe (Memory-Effekt) [117]. Um das zu verhindern, muss die Auswahl des Adsorbermaterials und der

Desorptionsbedingungen sehr sorgfältig erfolgen. Ebenso muss bei der Festlegung der Parameter darauf geachtet werden, dass es zu keiner vorzeitigen Desorption der extrahierten Analyten bereits während der Extraktion kommt. Dabei kann sich die Verwendung von sogenannten „Multibeds“ anbieten, bei denen verschiedene Adsorbentmaterialien schichtweise kombiniert werden [34]. Im Zusammenhang mit der Kryofokussierung ist zu beachten, dass ein zu hoher Wassereintrag zum Vereisen der Kühlfalle führen kann [137]. Dieses Risiko ist bei den Atemluftproben aufgrund der hohen Atemluftfeuchtigkeit durchaus gegeben.

Die dynamische Headspace (DHS) ist eine Abwandlung der Extraktion mit Adsorberröhrchen und stellt ein „Purge-and-Trap“-Verfahren dar. Während des „Purgens“ (Spülphase) wird die Probe einem kontinuierlichen, inerten Gasstrom mit dem Spülgas ausgesetzt [128]. Dadurch werden die Substanzen im Gasraum (HS) der Probe abgeführt und die Gleichgewichtseinstellung zwischen Probe und HS wird stetig gestört. Daraus folgt eine kontinuierliche Freisetzung von Substanzen aus der Probe in den HS. Das mit Substanzen angereicherte Spülgas fließt beim „Trappen“ (Anreicherungsphase) durch ein Adsorberröhrchen, so dass die Analyten angereichert werden. Das weitere Vorgehen entspricht dem bei der Extraktion mit Adsorberröhrchen. Die Vor- und Nachteile sind ähnlich der weiter oben für die Adsorptionsröhrchen beschriebenen. Bei der DHS kommt als Vorteil hinzu, dass sie automatisierbar ist und durch die ständige Störung des Gleichgewichts vergleichsweise höhere Anreicherungsfaktoren erzielt werden können [128].

Nachdem die Analyten durch die Probenaufgabe in das GC-System eingebracht und durch Interaktion mit der GC-Kapillarsäule getrennt wurden, müssen die eluierenden Substanzen detektiert werden. Pauling *et al.* [4] setzten 1971 dafür noch einen Flammenionisationsdetektor ein. Gegenwärtig wird jedoch hauptsächlich die Massenspektrometrie angewendet. Dieses Detektionsverfahren wird nachfolgend näher vorgestellt.

Massenspektrometrie als Detektionsverfahren für die Gaschromatographie

Gaschromatographie wird in der Atemluftanalytik häufig mit der massenspektrometrischen (MS)-Detektion gekoppelt (Abbildung 6) [117, 137]. GC-MS-Methoden gelten als robust und sensitiv [107]. Bei der MS werden gasförmige, ionisierte Moleküle in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einem Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt [128]. Häufig eingesetzte Analysatoren sind Quadrupolfilter, Ionenfallen und Flugzeitmassenspektrometer [34, 107], wobei das erstgenannte Verfahren am weitesten verbreitet ist. Ein sehr großer Vorteil der MS ist die Möglichkeit, unbekannte Substanzen zu identifizieren [128]. Neben der Bibliothekssuche erlauben hochauflösende Verfahren eine Identifizierung über die Bestimmung der exakten Masse.

Um Substanzen mittels MS detektieren zu können, müssen diese ionisiert werden. Das am häufigsten verwendete Verfahren ist die Elektronenstoßionisation (EI); aber auch die Anwendung der chemischen Ionisation (CI) kann für bestimmte Fragestellungen zielführend sein. Beide Ionisationsmethoden werden im Weiteren kurz beschrieben.

Die EI ist ein Standardprinzip in der GC-MS-Analytik [128]. Durch Interaktion der Analyten mit einem Elektronenstrahl kommt es zu einer Ionisierung der Moleküle. Aufgrund des hohen Energieeintrages erfolgt häufig zusätzlich eine strukturabhängige Fragmentierung, so dass die EI zu den harten Ionisierungstechniken zählt; folglich sind in einem solchen MS-Spektrum auch Strukturinformationen enthalten [128]. EI-Spektren, die mit einer Standardionisierungsenergie von 70 eV detektiert werden, weisen eine vergleichbare Fragmentierung auch an verschiedenen Geräten auf. Aus diesem Grund gibt es umfassende Datenbanken mit Literaturspektren, die durch den Vergleich des aufgenommenen Spektrums einer Substanz eine Identifizierung ermöglichen [128]. Die Identifizierung wird jedoch erst durch Vergleich mit einer authentischen Substanz sicher. Dabei müssen die Massenspektren der unbekannten Substanz und der Standardverbindung übereinstimmen. Im Fall der GC-MS-Kopplung müssen außerdem die Retentionszeiten konsistent sein [128].

Munson und Field entwickelten 1966 die CI [138]. Dabei wird ein Reaktionsgas in die Ionisierungskammer eingebracht, welches stabile Ionen bildet. Kommen nun geringe Mengen eines Analyten in die Ionisierungskammer hinzu, erfolgt die Ionisierung dieser Moleküle durch Anlagerung oder Ladungsübertragung der Primärionen [138]. Die CI gehört zu den weichen Ionisierungsformen, da hauptsächlich Molekül- oder Quasimolekülionen und nur wenige Fragmente gebildet werden [128]. Als Reaktionsgas können z. B. Methan, Ammoniak und Wasser eingesetzt werden [128].



Abbildung 6: Modernes GC-MS-System mit Autosampler

Neben der GC-MS-Analyse von Atemluftproben gibt es noch weitere Analysetechniken, die nachfolgend kurz umrissen werden.

Weitere Analysetechniken in der Atemluftanalytik

Selected ion flow tube-MS ist eine Online-Technik und erlaubt somit Echtzeitanalysen [139]. Mit ihr kann keine Vortrennung der im Atem enthaltenen VOC vorgenommen werden. Bei der Selected ion flow tube-MS wird mit positiv geladenen Ionen ionisiert. Dadurch eignet sich diese Technik gut zur Detektion von polaren Komponenten, aber z. B. nicht für aliphatische Alkane [139]. Im Scan-Modus wird ein summarisches Massenspektrum aller in der Probe ionisierbaren Substanzen erhalten. Dabei können mehrere unterschiedliche Substanzen dasselbe Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufweisen. Dann erscheinen sie als ein Signal im Spektrum, wodurch eine Identifizierung einzelner Komponenten nur selten möglich ist. Jedoch können die detektierten Spektren in ihrer Gesamtheit als Profil bzw. Muster ausgewertet werden [139].

Die Ionenmobilitätsspektrometrie basiert auf dem Drift von Ionen in einem Trägergas im elektrischen Feld [140]. Diese Bewegung erfolgt mit der substanzspezifischen Ionenwanderungsgeschwindigkeit, wodurch ein Anhaltspunkt für die Identifizierung von Analyten gegeben ist [140]. Jedoch ist die Auflösung eher gering; hinzu kommt, dass es bei der Ionenmobilitätsspektrometrie zur Reaktion der Analyten untereinander kommen kann [140]. Aus diesem Grund ist diese Technik für die Identifizierung unbekannter Verbindungen nicht geeignet. Das wird erst bei Kombination mit einer Trennmethode, wie der GC, oder einer substanzspezifischeren Detektionsmethode, wie der MS, ermöglicht. Ohne diese Kopplungen ist der Einsatz der Ionenmobilitätsspektrometrie in der Atemluftanalytik auf den Vergleich von VOC-Profilen beschränkt. Vor allem in Kopplungen mit anderen Techniken ist ein Einsatz als Offline-Methode möglich. Dadurch werden auch Anreicherungstechniken wie die SPME verfügbar. Da die Aufnahme eines Spektrums nur 10 bis 100 ms dauert, kann die IMS auch als Online-Verfahren angewendet werden [140].

Eine weitere Online-Methode ist die Protonentransferreaktions-MS (PTR-MS) [141]. Es handelt sich dabei um eine CI, bei der häufig Wasserdampf als Reaktionsgas eingesetzt wird. Die Ionisierung mit den H_3O^+ -Ionen findet für solche Moleküle statt, deren Protonenaffinität größer als die von Wasser ist, womit z. B. kurzkettige Alkane ausgeschlossen sind [141]. Die ionisierten Moleküle besitzen nur

geringe Fragmentierungsneigung, so dass hauptsächlich Quasimoleküle detektiert werden. In der Atemluftanalytik ist die PTR-MS vor allem für die VOC-Profilanalyse geeignet. Erst durch Kopplung mit einem Trennverfahren, wie z. B. der GC, werden ausreichende Informationen für eine Substanzidentifizierung verfügbar [141].

Atemluft kann auch mit spektroskopischen Methoden untersucht werden. Mit der Infrarot-Laserspektroskopie in der Form der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie oder der Tuneable-Diode-Laser-Absorptions-Spektroskopie können einzelne, lichtabsorbierende Substanzen mit hoher Selektivität und Sensitivität untersucht werden; diese Analysen können online in Echtzeit durchgeführt werden [117]. Das angewendete Grundprinzip entspricht dem der Infrarotspektroskopie, bei dem unter Lichtabsorption Schwingung und Rotation angeregt werden.

Ein weiteres großes messtechnisches Feld in der Atemluftanalytik ist die Anwendung von Sensorarrays [137], manchmal auch als „elektronische Nasen“ bezeichnet [142]. VOC, die auf die einzelnen Sensoren treffen, werden adsorbiert und verändern dabei die Eigenschaften des Sensors, z. B. die elektrische Leitfähigkeit oder die Farbe [143]. Der Grad der Änderung ist dabei substanz- oder substanzklassen- sowie konzentrationsabhängig [144]. Sie zeichnen sich durch eine relativ einfache Herstellung und geringe Anschaffungskosten aus [143]. Die geringe Größe von Sensorarrays erlaubt einen mobilen Einsatz [117]. Sensorarrays ermöglichen keine Substanzidentifikation und können daher nur zur Mustererkennung eingesetzt werden. Problematisch können Kreuzsensitivitäten sein. Darüber hinaus sind sie vergleichsweise unempfindlich, was ihren Einsatz in der Atemluftanalyse bisher limitiert [117].

Die Übereinstimmung der mit diesen verschiedenen Analyseverfahren erhaltenen Ergebnisse kann nicht vorausgesetzt werden. Dementsprechend wäre es sehr hilfreich, wenn es ein Referenzmaterial gäbe, über dessen Analyse die Vergleichbarkeit der Methoden untersucht werden könnte. Ein solches Material existiert bisher nicht und wird sicher nur schwer zu realisieren sein. Das Referenzmaterial müsste in einer Form bereitgestellt werden, die für alle eingesetzten Verfahren geeignet ist. Die besprochenen Analysetechniken besitzen jedoch unterschiedliche Schnittstellen für die Probenapplikation. Des Weiteren sind die untersuchten Substanzen im Atem sehr vielfältig, was zu der Frage führt, welche Substanzen das Referenzmaterial enthalten sollte. Ferner sind einige Substanzen instabil, wodurch mit Schwierigkeiten bei der Lagerstabilität eines Referenzmaterials zu rechnen wäre.

Wie soeben ausgeführt, ist die Übereinstimmung der Ergebnisse von verschiedenen Studien selten gegeben. Aber auch schon innerhalb einer Studie ist häufig nicht nachvollziehbar, wie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über den Studienzeitraum gewährleistet wurde. Die eingesetzten statistischen Datenauswertungsverfahren basieren auf semiquantitativem Vergleich von Signalintensitäten oder quantitativem Vergleich von Substanzgehalten. Diese Auswertung setzt jedoch reproduzierbare Analysenergebnisse und somit eine gleichbleibende Leistungsfähigkeit der eingesetzten Analysenmethode voraus. Es ist zu vermuten, dass die Studien über einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten durchgeführt wurden, weil zum Teil hohe Probenzahlen angegeben sind; konkrete Aussagen zum Studienzeitraum fehlen aber oft in den Publikationen. Folglich muss die Stabilität des Systems über diesen Zeitraum sichergestellt werden. Ansonsten könnten unterschiedliche Substanzkonzentrationen auch durch eine schwankende Empfindlichkeit des Analysensystems verursacht werden. Ob und wie eine Reproduzierbarkeit der Messergebnisse über den Studienzeitraum gewährleistet wurde, ist häufig nicht angegeben, wie z. B. in [18, 53, 67, 77].

Die quantitative Analyse der Atemproben liefert Gehalte einzelner VOC in der Atemluft. Bei einer ausreichend hohen Anzahl an Proben können statistische Auswerteverfahren eingesetzt werden, um auf potentielle Biomarker zu schließen.

2.3.3 Statistische Auswertung von Analysenergebnissen zur Biomarkeridentifikation

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie aus den ermittelten VOC-Gehalten in Atemluftproben potentielle Biomarker abgeleitet werden können. Dabei handelt es sich um statistische Verfahren, die in der Form von Software verfügbar sind, so dass die aufwendigen Rechnungen automatisiert durchgeführt werden können. Neben den Analysenergebnissen für Patienten werden auch die Messergebnisse für eine Vergleichsgruppe gesunder Probanden benötigt.

Bei der Auswahl der statistischen Verfahren ist zu beachten, dass für einige parametrische Tests Vorbedingungen erfüllt sein müssen. Ein häufiges Kriterium ist die Normalverteilung der Daten, die mit verschiedenen Tests (Shapiro-Wilk-Test, Lilliefors-Test, Kolmogorov-Smirnov-Test, Anderson-Darling-Test, Chen-Shapiro-Test) geprüft werden kann [145]. Gerade bei Analysen in natürlichen Systemen ist selten eine Normalverteilung der erhaltenen Messdaten zu beobachten; anstelle dessen entspricht die Datenverteilung häufig einer logarithmischen Normalverteilung. Wenn diese auch nicht bestätigt werden kann, können nicht-parametrische Tests zur Anwendung kommen. Darüber hinaus sind manche Verfahren, die eigentlich eine Normalverteilung voraussetzen, sehr robust und können trotz Nichterfüllung dieser Voraussetzung eingesetzt werden [145].

Im Weiteren ist vor Anwendung eines statistischen Testverfahrens zu prüfen, ob dieses robust gegenüber fehlenden Daten ist [145]. Ein fehlender Wert kann z. B. durch ein nichtauswertbares Messsignal zu Stande kommen oder auch durch ein Messergebnis, welches unter der Nachweisgrenze liegt. Wenn das gewählte Testverfahren ein Fehlwert nicht toleriert, kann auf den zugehörigen Datensatz verzichtet oder ein Stellvertreterwert eingeführt werden [146]. Die Auswahl solcher Werte ist sorgfältig durchzuführen, um die Aussagekraft der statistischen Auswertung zu bewahren [145, 146]. Falls in dem fehlenden Wert eine Information enthalten ist, lässt sich diese Information in dem Stellvertreterwert berücksichtigen. Dies ist z. B. möglich, wenn ein Analyt nicht nachweisbar ist. Darin ist die Information enthalten, dass der Gehalt unter der Nachweisgrenze ist. Ein geeigneter Stellvertreterwert ist z. B. ein Wert in Höhe der halben Nachweisgrenze. Falls der fehlende Parameter keine Information beinhaltet, kann der Stellvertreterwert so ausgewählt werden, dass er möglichst wenig Einfluss auf die Verteilung der übrigen Daten nimmt [146]. Dies bietet sich beispielsweise an, wenn ein durch Matrixkoelution nicht-auswertbares Signal ersetzt werden soll; als Stellvertreterwert kann der Median verwendet werden. Bei einem hohen Anteil an Fehldaten ohne Informationsgehalt führt eine statistische Auswertung häufig nicht mehr zu verlässlichen Ergebnissen. In diesem Fall sollte diese Variable nicht in die statistische Auswertung einbezogen werden.

Darüber hinaus kann es sinnvoll sein, die Daten vor Anwendung von statistischen Tests zu standardisieren [147]. Dadurch werden einheitenlose Werte generiert, so dass auch Daten mit verschiedenen Einheiten und mit sehr unterschiedlicher Größenordnung miteinander verglichen werden können. Das kann z. B. durch Berechnung der z-Scores erfolgen, bei der auf den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1 normiert wird [145].

Statistische Verfahren sind in univariate und multivariate Datenauswertungsmethoden unterscheidbar [145]. Bei univariaten Verfahren wird geprüft, ob sich verschiedene Gruppen (gesund und krank) in einer Variablen signifikant unterscheiden. Bei multivariaten Verfahren wird hingegen geprüft, ob eine Kombination mehrerer Variablen zu einem Modell führt, dass eine signifikante Unterscheidung beider Gruppen ermöglicht und darüber hinaus auch eine Einzelfallbetrachtung für jedes Objekt erlaubt. Die ermittelten Variablen sind dann die potentiellen Biomarker. Einige Beispiele für solche Tests werden nachfolgend kurz umrissen.

Der t-Test ist ein parametrischer, univariater Test, der normalverteilte Daten voraussetzt [148]. Er wurde bereits mehrfach in der Atemluftanalytik eingesetzt [11, 52, 71]. Mit diesem Test kann ermittelt werden, ob sich die Mittelwerte einer Variablen unter Beachtung der Standardabweichung für zwei Gruppen signifikant unterscheiden [145].

Der Mann-Whitney-U-Test wurde ebenfalls für die Identifikation potentieller Biomarker in Atemluft für die Lungenkrebsdiagnose eingesetzt [110, 136, 149, 150]. Dabei handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test, für den keine normalverteilten Daten vorliegen müssen. Mit diesem Test wird geprüft, ob sich die Rangsummen einer Variablen zwischen zwei Gruppen signifikant unterscheiden [145]. Die Rangsumme wird ermittelt, indem alle Messwerte einer Variablen unabhängig von der Gruppenzuordnung in aufsteigender Reihenfolge sortiert werden. Jedem Messwert wird dann entsprechend seiner Position in dieser Reihe eine Zahl (sein Rang) zugewiesen. Anschließend werden die Ränge für die jeweilige Gruppe addiert, um die Rangsumme zu erhalten.

Univariate Verfahren führen zu einer Unterscheidung von Gruppen [145], erlauben aber nicht unbedingt eine Einzelfallzuordnung. Dies kann am Beispiel des t-Tests verdeutlicht werden: Wenn die Mittelwerte einer Variablen zwischen zwei Gruppen signifikant verschieden sind, aber gleichzeitig die Varianz in beiden Gruppen recht hoch ist, ergibt sich eine geringe Trennschärfe und die Zuordnung eines einzelnen Objektes zu einer der beiden Gruppen ist mit großer Unsicherheit behaftet.

Der Einsatz multivariater Datenauswertungsmethoden ist im Bereich der Atemluftanalyse ebenso bekannt [107]. Um sogenannte „Voodoo-Korrelationen“, also statistische Zusammenhänge, die zufällig aufgrund einer zu hohen Anzahl berücksichtigter Variablen zustande kommen, zu vermeiden, muss die Anzahl der Proben deutlich höher sein als die Anzahl der in die Betrachtung integrierten Analyten. Dabei fordert Miekisch *et al.* [151] ein Verhältnis von fünf bis zehn zu eins, während gemäß der Horst'schen Regel [152] mindestens dreimal so viele Proben wie Analyten vorliegen sollten.

Ein multivariates Verfahren, mit dem gegebenenfalls unbekannte Strukturen in einem Datensatz aufgedeckt werden können, ist die hierarchische Clusteranalyse [147]. Sie wurde bereits in der Atemluftanalytik eingesetzt [153]. Dabei erfolgt die Gruppierung der einzelnen Proben zu Clustern, so dass Proben mit ähnlicher Analytausprägung nahe beieinander liegen, während sich stärker unterscheidende Proben voneinander getrennt werden. Als Ergebnis wird ein Dendrogramm erhalten, in dem Häufungen von Datensätzen in Clustern beobachtet werden können [147]. Ein typisches Beispiel ist in der Abbildung 7 dargestellt. Ist die Gruppenzugehörigkeit der Proben bekannt, kann mit solch einem Dendrogramm geprüft werden, ob die untersuchten Analyten zu einer Unterscheidung der Gruppen beitragen oder nicht.

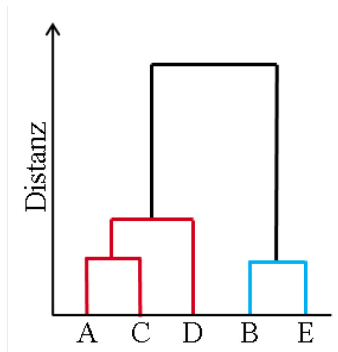


Abbildung 7: Beispieldarstellung für ein Dendrogramm mit fünf Objekten (A-E), die sich in zwei Cluster (rot, blau) unterteilen lassen; die Objekte A,C und D ähneln sich untereinander, unterscheiden sich jedoch zu B und E

Die Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) ist ein multivariates, strukturprüfendes Verfahren [145, 154]. Sie wurde bereits häufiger zur Identifizierung von Biomarkersets in Atemluft zur Lungenkrebsdiagnose eingesetzt [18, 77, 104, 155]. Es werden normalverteilte Daten vorausgesetzt [145]. Bei der LDA wird für die vorhandenen Datensätze, z. B. die Atemluftuntersuchungen der Patienten und Gesunden, auf Basis der vorhandenen Variablen ein Modell erstellt, so dass weitestgehend die vorgegebene Klassifizierung resultiert [145]. Das Modell soll dabei möglichst geringe Unterschiede innerhalb der Gruppen, aber eine maximale Differenz zwischen den Gruppen aufzeigen; für jedes einzelne Objekt wird eine Aussage zur Gruppenzugehörigkeit erhalten [154]. Mathematisch erfolgt die Modellerstellung durch gewichtete Linearkombinationen aller Analyten, die sich zu einen oder mehreren Faktoren, so genannten kanonischen Variablen, zusammenfassen lassen [145, 154]. Zwei

Beispiele für eine graphische Darstellung einer LDA sind in Abbildung 8 aufgezeigt. Eine einfache Validierung des erhaltenen Modells besteht in der Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOO). Dabei wird das Modell wiederholt unter Auslassung eines Datensatzes, z. B. eines Gesunden oder eines Kranken, berechnet. Das jeweils erhaltene Modell wird dann auf die bisher unberücksichtigte Probe angewendet und auf korrekte Zuordnung geprüft [145].

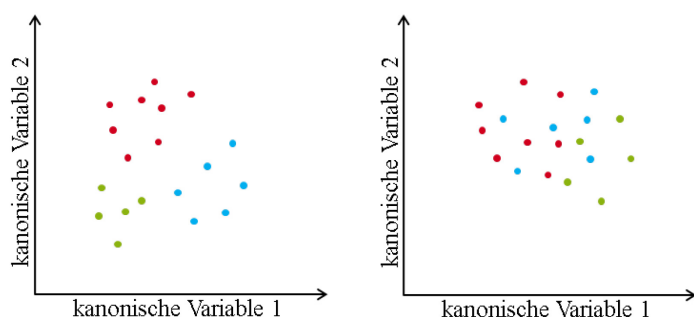


Abbildung 8: Beispieldarstellungen für Ergebnisse einer Diskriminanzanalyse mit 3 Objektgruppen (rot, blau, grün) und zwei kanonischen Variablen

links: Deutliche Differenzierung der drei Gruppen, die für die Modellerstellung verwendeten Variablen (z. B. Analyten) diskriminieren die drei Gruppen

rechts: Differenzierung von rot und grün, die blauen Objekte werden durch das Modell nicht von den anderen unterschieden

Sobald mittels statistischer Verfahren Biomarkerkandidaten für die Krankheitserkennung aus den Analysendaten extrahiert wurden, sollten diese abschließend kritisch bewertet werden.

2.3.4 Bewertung potentieller Biomarker für die Lungenkrebsdiagnose

Aufbauend auf der Probenahme und Analyse von Atemproben mit anschließender statistischer Auswertung der Analyseergebnisse können Biomarkerkandidaten für die Diagnostik von Lungenkrebs erhalten werden. Durch dieses Vorgehen ist jedoch zunächst einmal nur ein statistischer und kein kausaler Zusammenhang zwischen den potentiellen Biomarkern und der Krankheit gezeigt.

Bisher wurde in der Atemluft keine Substanz bestimmt, die nur bei Vorliegen einer Krankheit auftreten würde. Entsprechend ist der qualitative Nachweis einer Substanz für eine Diagnosestellung nicht ausreichend [137]. Folglich kann eine Lungenkrebserkennung nur durch Ermittlung eines quantitativen Unterschieds in den Gehalten potentieller Biomarker in der Atemluft ermöglicht werden. Allein schon daraus leitet sich die Notwendigkeit einer verlässlichen Quantifizierung für die Kandidatenverbindungen ab.

Außerdem wurden quantitative Veränderungen potentieller Biomarker in Verbindung mit verschiedenen physiologischen Zuständen beobachtet. Eine Vielzahl der nachgewiesenen Analyten treten sowohl in der Atemluft von Gesunden als auch von Kranken auf; hier geht es um die analytische Erfassung kleinster quantitativer Unterschiede. Zum Beispiel wurde 2-Butanon in geringer Menge im Atem von Gesunden beobachtet, während im Falle einer Lungenkrebserkrankung eine signifikante Erhöhung des Gehaltes in der Atemluft festgestellt werden konnte [76]. In anderen Studien wurde eine signifikante Beeinflussung des 2-Butanongehaltes bei einer Infektion mit *H. pylori* [17], bei Kehlkopfkrebs [156] und bei Tuberkulose [157] beschrieben. Dabei wird die Diskussion durch die weitgehende Unkenntnis der physiologischen Bedeutung vieler im Atem beobachteter Substanzen erschwert [137].

In der Diskussion um die Plausibilität von postulierten Biomarkern sind noch weitere Punkte zu beachten. Die Hintergrundproblematik (Blindwert), also der Eintrag von exogenen Komponenten in die Probe, stellt eine essentielle Frage in der Atemluftanalytik dar [108, 117]. Zum einen ist die akute Kontamination der Atemproben durch die in der Umgebungsluft enthaltenen Substanzen zu berücksichtigen. Dieser kann durch Beprobung der Alveolarluft begegnet werden (siehe Kapitel 2.3.1) oder auch durch die parallele Untersuchung von Blindwertproben und anschließende Subtraktion der Umgebungsgehalte von den Gehalten in der Atemluft [158]. Auch das Auswaschen der Lunge mit VOC-freier Luft im Vorfeld der Probenahme ist möglich [126]. Zum anderen kann eine einmalige Exposition gegenüber exogenen VOC auch längerfristig die Gehalte im Atem beeinflussen [35, 61].

Diese ehemalige Exposition kann durch die bereits beschriebenen Strategien nicht berücksichtigt werden, da sich diese exogenen Substanzen ja bereits im Körper befinden [35, 40]. Des Weiteren finden sich auch Metaboliten aus aufgenommenen Nahrungs- und Genussmitteln in der Atemluft wieder [35], worauf z. B. die Atemalkoholuntersuchung basiert. Aus diesem Grund ist eine kritische Betrachtung der Herkunft von potentiellen Biomarkern unerlässlich.

Folglich reicht es nicht aus, den statistischen Zusammenhang zwischen einer Krankheit und dem Gehalt einzelner VOC oder Substanzgruppen im Atem aufzuzeigen. Um Biomarker zu evaluieren, sollte eine plausible Begründung für ihren endogenen Ursprung dargelegt werden [40, 109].

Trotz einiger Limitierungen scheint die Atemluftanalytik mit der nicht-invasiven Probenahme ein vielversprechendes Verfahren zu sein, welches zu einer Früherkennungsmethode zur Unterstützung der Lungenkrebsdiagnose führen könnte. Basierend auf dem dargestellten Stand der Literatur sollten nun in einem multidisziplinären Ansatz in Kooperation mit Wissenschaftlern anderer Disziplinen verschiedene Strategien verfolgt werden, um Biomarker für die Lungenkrebsdiagnose zu identifizieren.

3 Experimenteller Teil

Der experimentelle Teil gliedert sich in die in Abbildung 9 benannten Kapitel. Die sonst üblicherweise am Anfang dieses Kapitels gelistete Aufzählung der eingesetzten Chemikalien, Gerätschaften und Software befindet sich im Anhang A.1 (Anhang Tabelle 1 bis Anhang Tabelle 6, ab Seite A-2). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in diesem Kapitel nur die für das Verständnis wesentlichen Versuchsbedingungen angegeben, während sich die ausführlichen Versuchsbeschreibungen in den Anhängen A.2-A.7 befinden. Um die Darstellung der durchgeführten Arbeiten zu erleichtern, werden hier nur solche Arbeiten beschrieben, die für die Ableitung potentieller Biomarker für die Lungenkrebsdiagnose in Atemluft essentiell waren; darüber hinaus gehende Ergebnisse werden in Kapitel 4.4 ab Seite 113 ohne Angabe einer Versuchsdurchführung zusammengefasst.

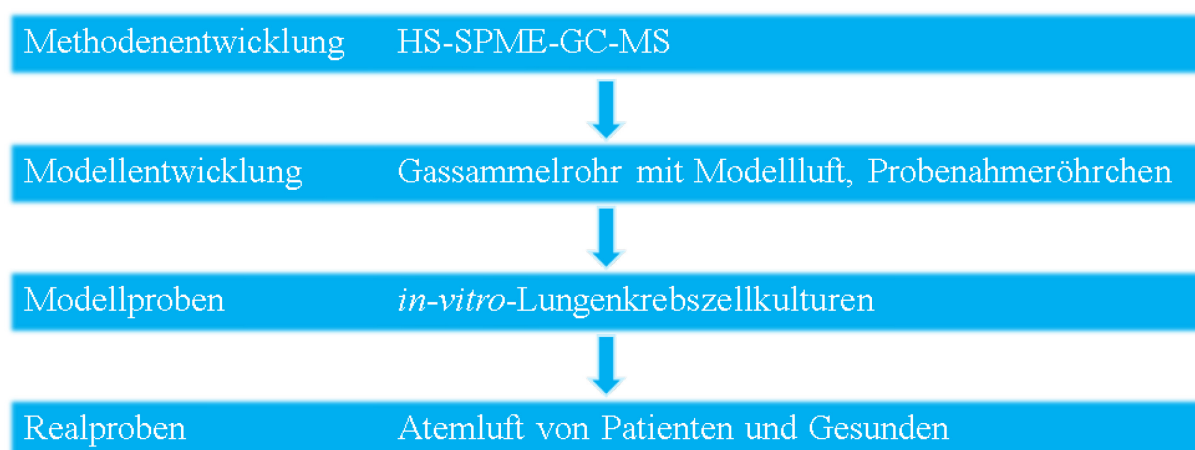


Abbildung 9: Reihenfolge des Vorgehens bei den experimentellen Arbeiten

Voraussetzung für die Suche nach Biomarkern war ein geeignetes Analysenverfahren. Die Entwicklung einer GC-MS-Methode ist nachfolgend beschrieben.

3.1 HS-SPME-GC-MS-Methodenentwicklung für die VOC-Analytik

Erste Optimierung der GC-Methode: Variation des Ofenprogramms

Zu Beginn der Arbeiten lag eine GC-MS-Methode zur Trennung von n-Aldehyden mit der Kettenlänge C₄-C₁₀ unter Einsatz einer VF-624ms-GC-Kapillarsäule und einer Flussrate von 1,0 mL·min⁻¹ vor. Die geplante Erweiterung des Analytspektrums auf weitere Substanzklassen (vgl. auch Kapitel 2.2) erforderte eine Modifizierung der bestehenden Methode. Deswegen wurde zunächst die vorhandene GC-Methode mit dem Ziel, eine höhere Anzahl leichtflüchtiger Substanzen trennen zu können, modifiziert. Über mehrere Schritte wurde das Temperaturprogramm des GC-Ofens verändert und dabei an Standardgemischen mit insgesamt 40 verschiedenen VOC getestet. Die Ausgangsbedingungen und die optimierten Bedingungen für das Ofenprogramm sind in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tabelle 3: Anpassung des GC-Ofenprogramms für die VOC-Analytik auf Basis der bestehenden Methode zur Trennung von Aldehyden im Rahmen der ersten Optimierung

Methode	Heizrate / °C·min ⁻¹	Temperatur / °C	Haltezeit / min	Gesamtlaufzeit / min
Aldehyde	20	40 280	5 5	22
VOC	4 20	40 140 260	5 5 4	45

Von den 40 untersuchten VOC waren mit der optimierten Methode 28 Substanzen basisliniengetrengt erfassbar (Abbildung 10). Die wenigen auftretenden Koelutionen sind für die Auswertung unproblematisch, da Fragmente mit spezifischen m/z -Verhältnissen detektiert werden können. Diese GC-Methode mit optimiertem Ofenprogramm wurde für die unten beschriebene Auswahl einer Probenanreicherungs-methode und für einige Schritte in der Modellentwicklung (s. Kapitel 3.2) eingesetzt.

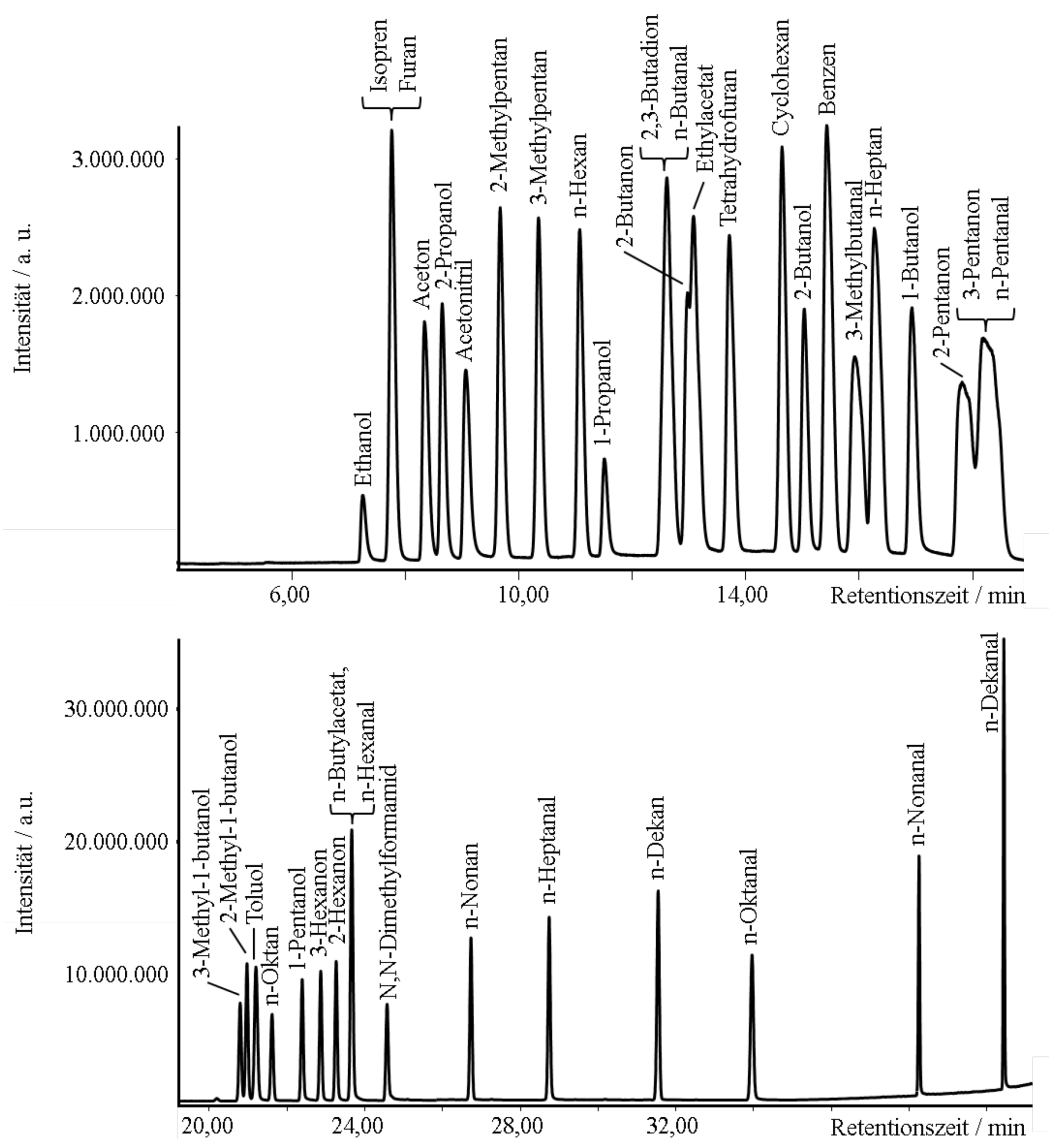


Abbildung 10: GC-MS-Chromatogramm eines Standardgemisches mit 40 VOC bei Anwendung des ersten optimierten GC-Ofenprogramms; 28 Substanzen wurden basisliniengetrengt detektiert

Zweite Optimierung der GC-Methode: Vergleich verschiedener GC-Säulen

Während der ersten Methodenoptimierung konnte durch Variation des Ofenprogramms die Anzahl basisliniengetrengter Substanzen erhöht werden. Jedoch hängt die Auflösung bei der Gaschromatographie noch von weiteren Parametern ab, wie z. B. der Zusammensetzung der stationären Phase. Deswegen wurde im Verlauf der Arbeiten eine zweite Optimierung der GC-Methode vorgenommen, bei der drei verschiedene, in der VOC-Analytik gebräuchliche GC-Säulen getestet wurden. Für diese Säulen erfolgten eine Anpassung des Ofenprogramms und eine Variation des Trägergasflusses. In Tabelle 4 sind die optimierten Bedingungen angegeben. Die beiden Filmsäulen verhielten sich sehr ähnlich, während für die Partikelsäule ein stärker abweichendes Ofenprogramm erarbeitet wurde. Bei allen drei Säulen führte die Erhöhung des Helium-Trägergasflusses von ursprünglich $1,0$ auf $1,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ zu einer erhöhten Peakschärfe und damit zu einer verbesserten Trennung.

Tabelle 4: Parameter von GC-Methoden mit verschiedenen GC-Säulen für die VOC-Analytik im Rahmen der zweiten Optimierung

GC-Säule	Säulentyp	Flussrate / mL·min ⁻¹	Ofenprogramm			
			Heizrate / °C·min ⁻¹	Temperatur / °C	Haltezeit / min	Laufzeit / min
VF-624ms 60 m x 0,32 mm x 1,8 µm	Filmsäule	1,4	-	40	5	45
			4	140	5	
			20	260	4	
HP-VOC 60 m x 0,32 mm x 1,8 µm	Filmsäule	1,4	-	40	5	50
			3	140	-	
			20	260	5,7	
CP PoraBOND Q 25m x 0,25mm x 3µm	Partikelsäule	1,4	-	40	-	50
			10	140	5	
			5	300	3	

Diese GC-Methoden wurden auf ein erweitertes Analytspektrum von 81 Substanzen angewendet. Die Verbindungen, die Zusammensetzung der Standardlösungen sowie weitere Messparameter, die keiner Optimierung unterlagen, sind im Anhang beschrieben (ab Seite A-7). Die Trennleistung der drei in Tabelle 4 angegebenen Methoden ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Mit allen drei GC-Säulen konnten ca. 50 % der untersuchten VOC basisliniengetrennt werden, während bei einem Viertel der Verbindungen Koelution ohne Antrennung zu beobachten war. Damit war die Performance der drei Methoden ähnlich. Es kam weiterhin die GC-Säule VF-624ms zum Einsatz, da bei dieser Methode die Anzahl der basisliniengetrennten Substanzen am höchsten war.

Die aus der zweiten Optimierung hervorgegangene GC-MS-Methode wurde mit Ausnahme des Vorversuches für alle Untersuchungen an Zellkulturen und Realproben sowie für die meisten Versuche mit dem Gasmodell eingesetzt.

Nachdem die GC-Methode mit dem Ziel optimiert worden war, dass eine hohe Anzahl von VOC erfasst werden konnte, musste als nächstes ein geeignetes Anreicherungsverfahren ausgewählt werden.

Tabelle 5: Anzahl basisliniengetrennter, angetrennter und koelulierender VOC bei Anwendung der in Tabelle 4 angegeben Bedingungen auf Standardgemische mit 76 nativen und fünf deuterierten VOC

GC-Säule	Anzahl basisliniengetrennter VOC	Anzahl angetrennter VOC	Anzahl koelulierender VOC
VF-624ms	40	19	22
HP VOC	36	27	18
CP PoraBOND Q	37	24	20

Auswahl einer Anreicherungs-methode: Vergleich verschiedener Materialien für DHS und SPME

Für die Analyse von Atemluftproben ist aufgrund der zu erwartenden geringen Analytgehalte (ppm-ppt) ein Anreicherungsschritt notwendig. Dafür bieten sich sowohl die Adsorption auf Röhrchen mit Festphasen, z. B. als DHS-Methode, als auch die Anwendung der SPME an (vgl. Kapitel 2.3.2).

Die Wahl des Adsorbermaterials bzw. des SPME-Fasermaterials beeinflusst entscheidend die Spezifität, Selektivität und Empfindlichkeit der Analyse. Darüber hinaus sind bei der DHS die Geschwindigkeit des Gasflusses, die Gasmenge und die Temperatur zu beachtende Einflussfaktoren, während bei der SPME neben der Temperatur vor allem die Extraktionszeit wichtig ist. Sowohl für die DHS-Adsorbermaterialien als auch für die SPME sollte jeweils ein für die VOC-Analytik geeignetes Material ausgewählt werden.

Der Vergleich verschiedener SPME-Fasern und Adsorbermaterialien erfolgte mit VOC-haltigen Standardlösungen in Methanol. Dieses Lösungsmittel mit einer molaren Masse von 32 g·mol⁻¹ hat den Vorteil, dass es aufgrund des gewählten Massenfensters für die Scan-Aufzeichnung (ab m/z 35 u) nicht detektiert wird und somit kein störender Lösungsmittelpeak im Chromatogramm auftaucht. Das VOC-Standardgemisch wurde in HS-Vials eingebracht, um die Extraktionsverfahren mit

anschließender GC-MS-Analytik durchzuführen. Dabei ergaben sich in den Vorversuchen zwei Problemfelder, auf die zunächst kurz eingegangen werden soll.

Zum einen traten bei Wiederholungsanalysen nicht-reproduzierbare Ergebnisse auf. Es kam der Verdacht auf, dass gegebenenfalls die eingesetzten Vials, die mit verschiedenen Septenmaterialien verschlossen werden können (Abbildung 11), undicht waren. Aus diesem Grund wurde ein systematischer Vergleich durchgeführt. In neue SPME-Rollrandvials und Feingewindevials wurde eine definierte Menge Methanol pipettiert, mit verschiedenen Dichtungsmaterialien verschlossen und über mehrere Tage das Gewicht erfasst. Da die erhaltenen Ergebnisse bereits in der GIT Laborfachzeitschrift veröffentlicht sind (vgl. auch Publikationsliste Seite xi), wird hier nur kurz auf die Schlussfolgerungen eingegangen. Für die verschiedenen Materialien konnten Unterschiede in der Abdichtung in Abhängigkeit der Septendicke und der Härte ermittelt werden. Jedoch ergab sich auch bei den ungünstigsten Bedingungen nur ein Verlust von maximal 15 %. Damit waren die während der Vorversuche beobachteten Schwankungen nicht vollständig zu erklären. Da für die ersten Versuche ältere Septen zum Einsatz gekommen waren, lag die Vermutung nahe, dass das Material durch die Lagerung im Labor gealtert war. Deswegen wurden im Weiteren nur noch neue Septen verwendet. SPME-Rollrandvials wurden bevorzugt mit Bördelkappen mit Butyl/PTFE oder Silikon/PTFE-Septen verschlossen. Wenn Feingewindevials mit Silikon/PTFE-Septen zum Einsatz kamen, wurden die Septen mit einer höheren Schichtdicke von 1,5 mm verwendet.



Abbildung 11: SPME-Rollrandvial, Feingewindevial, Bördelkappen und Schraubdeckel mit verschiedenen Septenmaterialien

Zum anderen zeigte sich die Notwendigkeit einer großen Sorgfalt bei der Herstellung und Lagerung der VOC-Standardlösungen, um eine reproduzierbare und über den Verwendungszeitraum konstante Zusammensetzung zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde im Laufe der Arbeit die Prozedur der Standardherstellung und -lagerung immer wieder kritisch betrachtet und schließlich folgendes Vorgehen entwickelt: Die Herstellung der Lösungen erfolgte gravimetrisch im Maßkolben (1-10 mL). Zum Pipettieren von Standardsubstanzen kamen Kolbenhubpipetten zum Einsatz, während die Lösungsmittelzugabe mit einer Pasteurpipette realisiert wurde. Jede Zugabe erfolgte unter dem Abzug mit nur kurzzeitigem Öffnen des Maßkolbens. Als erstes wurde stets eine Vorlage aus Lösungsmittel eingebracht. Diese war so bemessen, dass nach Hinzufügen aller weiteren Substanzen nur noch ein geringes Lösungsmittelvolumen zum Auffüllen notwendig war. Bei jeder Substanzzugabe wurde darauf geachtet, dass diese langsam am Halsinneren des Maßkolbens nach unten floss. Darüber hinaus wurde ein unnötiger Kontakt zur Handfläche vermieden und das Erwärmen des Maßkolbens reduziert. Für das Mischen nach dem Auffüllen wurde der Maßkolben mehrmals langsam umgewendet. Gebrauchsfertige Lösungen wurden in Certan®-Flaschen überführt. Dabei war auf einen hohen Füllstand zu achten, damit der Dampfraum über der Lösung möglichst gering blieb. Die Überführung in die Certan®-Flaschen erfolgte mit Pasteurpipetten in einer Weise, dass in der Lösung keine Gasblasen entstanden. Ferner wurde die gefüllte Pipette in der Certan®-Flasche auf den Boden aufgesetzt, um beim Ablassen der Lösung ein Auftropfen auf den Gefäßboden zu verhindern. Die Lagerung der Lösungen in den Certan®-Flaschen erfolgte gekühlt bei ca. 6 °C (wässrige Lösungen).

oder -20 °C (methanolische Lösungen). Es wurden stets nur die gebrauchsfertigen Lösungen gelagert, da eine erneute Verwendung der Stammlösungen nicht möglich war.

Nach Überwindung dieser zwei größeren Hindernisse konnten die Experimente zur Auswahl einer Anreicherungstechnik fortgeführt werden. Für den Vergleich von fünf Adsorbermaterialien für die DHS und neun SPME-Fasern (Tabelle 6) erfolgte die Untersuchung von 23 VOC verschiedener chemischer Substanzklassen (Alkane, Aldehyde, Aromaten, Alkene, Alkohole, Ketone, vgl. Anhang Tabelle 11 Seite A-8).

Tabelle 6: Liste der getesteten DHS-Adsorbermaterialien und SPME-Fasern

DHS-Adsorbermaterial	SPME-Faser
Tenax TA	Car/PDMS 75 µm
Tenax GR	Car/PDMS 85 µm
PDMS Schaum	PDMS 7 µm
PDMS Granulat	PDMS 30 µm
Carbopack B/X	PDMS 100 µm
	PDMS/DVB 65 µm
	DVB/Car/PDMS 50/30 µm
	PA 85 µm
	PEG 60 µm

Car: Carboxen, DVB: Divinylbenzen, PA: Polyamid, PEG: Polyethylenglykol, PDMS: Polydimethylsiloxan

Die Ergebnisse für die fünf DHS-Adsorbermaterialien und für die neun SPME-Fasern sind in Abbildung 12 dargestellt. Für die Adsorbermaterialien wird deutlich, dass der Einsatz der porösen Polymere Tenax TA und Tenax GR zu einer im Vergleich zu den anderen Materialien geringeren Selektivität bei gleichzeitig höheren Signalfächen führte. Ungünstig ist, dass mit keinem der getesteten Adsorbermaterialien die Substanzen n-Pentan, 2-Methylpentan und Isopren erfasst werden konnten. Hier war wahrscheinlich die Adsorptionswirkung für diese Analyten zu gering, so dass sie bereits mit dem Spülgas ausgetragen wurden. Durch Anwendung der SPME-Technik konnten hingegen alle untersuchten Verbindungen erfasst werden. Die höchsten Signalintensitäten wurden durch Verwendung der Car/PDMS-Fasern erhalten.

Im Vergleich der beiden Anreicherungstechniken wird deutlich, dass die SPME mit Car/PDMS-Fasern effizienter ist. Zum einen waren mit dieser Faserbelegung auch sehr kurzkettige, unpolare Verbindungen detektierbar. Zum anderen wurden geringere relative Standardabweichungen, also bessere Wiederholbarkeiten, im Vergleich zu den Tenax-Materialien festgestellt. Hinzu kommt, dass die Verwendung der DHS-Adsorbermaterialien mit deutlich mehr Aufwand für den längeren Konditionierungsprozess und erhöhten Kosten durch den Kühlmiteleinsatz für die Kryofokussierung verbunden ist. Außerdem war in Blindwertuntersuchungen von Tenax TA und Tenax GR eine relativ hohe Grundbelastung feststellbar. Aus diesem Grund wurde im Weiteren der Fokus auf die Anreicherung mit der SPME-Faser Car/PDMS 75 µm gelegt.

Der Einsatz von Fasern mit Car/PDMS-Belegung erfolgte bereits in der Analyse des VOC-Profiles von Atemluftproben [67, 76, 78] und in der Untersuchung von reseziertem Lungengewebe [53, 159]. Car/PDMS-Fasern sind bipolar [134]. Dadurch eignet sich dieses Material besser für die Untersuchung chemisch unterschiedlicher VOC als reine PDMS-Fasern bzw. PA- oder CW/DVB-Fasern, die jeweils spezifischer für unpolare bzw. polare Verbindungen sind (vgl. Tabelle 2, Seite 13).

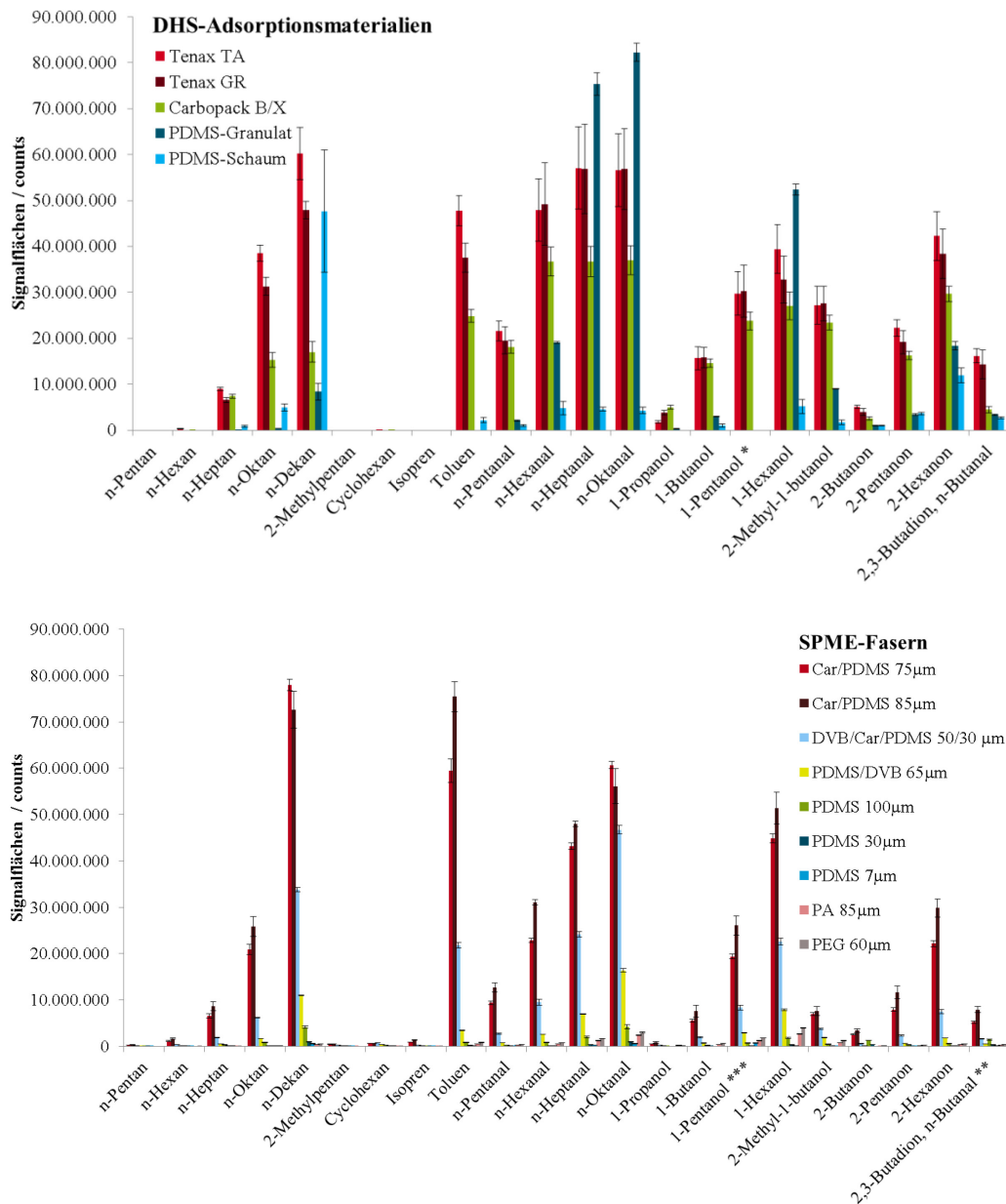


Abbildung 12: Vergleich der in den GC-MS-Chromatogrammen ermittelten Signalfächen (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) für 23 VOC von fünf DHS-Adsorbermaterialien (oben) und neun SPME-Fasern (unten)

*: Koelution mit Substanz aus dem Adsorbermaterial PDMS (Granulat, Schaum), **: Koelution mit Substanz aus der PDMS-Faser (30, 100 µm) und PEG-Faser (60 µm), ***: Koelution mit Substanz aus der PDMS-Faser (7, 30, 100 µm)

Zusammenfassung der GC-MS-Methodenentwicklung

Zusammenfassend stand nach Abschluss der Optimierungsexperimente eine SPME-GC-MS-Methode für die VOC-Analytik zur Verfügung (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenfassung der Parameter der HS-SPME-GC-MS-Methode hervorgegangen aus der zweistufigen Optimierung

SPME-Faser	Car/PDMS 75 µm			
GC-Säule	VF-624ms, 60 m x 0,32 mm x 1,8 µm			
Trägergasfluss	1,4 mL Helium·min ⁻¹			
Ofenprogramm	Heizrate / °C·min ⁻¹	Temperatur / °C	Haltezeit / min	Laufzeit / min
	-	40	5	
	4	140	5	
	20	260	4	45

In Abbildung 13 findet sich beispielhaft ein Chromatogramm für die Anwendung der optimierten Methode auf ein Standardgemisch mit 24 Zielsubstanzen, deren Untersuchung in Realproben im Fokus stand (vgl. Kapitel 3.4.2).

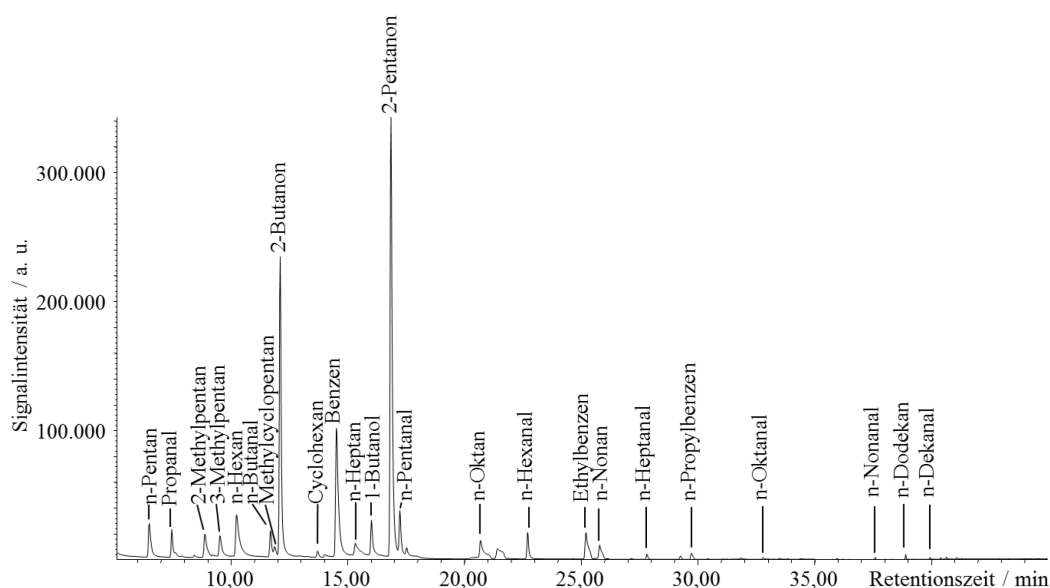


Abbildung 13: HS-SPME-GC-MS-SIM-Chromatogramm eines Standardgemisches mit 24 Zielsubstanzen bei Anwendung der optimierten Parameter

Bisher erfolgte noch keine Betrachtung der für die SPME wichtigen Parameter Extraktionstemperatur und -zeit, weil diese Bedingungen auf die zu untersuchende Matrix abzustimmen waren. Nachdem eine Methode entwickelt und optimiert worden war, die sich für die Analyse verschiedener VOC eignete, erfolgte als nächstes die Entwicklung eines Modells für Atemluftproben.

3.2 Modellentwicklung

Eine reale Atemluftprobe ist ein kostbares und unikates Material. Um Proben von Patienten für Forschungszwecke nehmen zu dürfen, muss ein positives Ethikvotum vorliegen. Ferner ist es problematisch, ausreichend geeignete Lungenkrebspatienten in den Kliniken zu finden, die sich zur Studienteilnahme bereit erklären. Deswegen war zunächst ein Modell zu entwickeln, mit dem die Analytik weiter optimiert und erste Erfahrungen gewonnen werden konnten. Parallel dazu waren auch strategische Überlegungen zur Probenahme realer Atemluft notwendig.

3.2.1 Gasmodell für die Atemluftanalytik auf Basis von Gassammelrohren

Modell aus trockener synthetischer Luft

Ein Modell für Atemluft sollte auf einer Matrix basieren, die der Atemluft nachempfunden ist, damit die geplanten Analysen mit HS-SPME-GC-MS praxisnah erfolgen konnten. Die Hauptkomponenten der Atemluft sind Stickstoff und Sauerstoff. Daher bot es sich an, kommerziell verfügbare, synthetische Luft (80% Stickstoff, 20% Sauerstoff) als Grundlage zu verwenden.

Die synthetische Luft musste in ein geeignetes Gefäß eingebracht werden. Idealerweise sollte es sich dabei bereits um den Probenahmekörper handeln, der später für die Erzeugung von Realproben eingesetzt werden sollte. Wie in Kapitel 2.3.1 dargestellt, sind Glaskörper, Polymerbeutel und Stahlgefäße am weitesten verbreitet. Stahlgefäße bergen das Risiko, dass reaktive Moleküle, wie z. B. Aldehyde, mit der Metalloberfläche reagieren könnten [114]. Polymerbeutel besitzen zwar ein Nennvolumen, sollen aber laut Herstellerangaben nur bis maximal 80 % gefüllt werden, so dass das exakte Probenvolumen bei jeder Probenahme zusätzlich zu bestimmen ist. Ferner ist bekannt, dass die Polymerbeutel einerseits selbst VOC emittieren und somit eine potentielle Kontaminationsquelle

darstellen und andererseits für einige Komponenten durchlässig sind [111]. Beides wäre bei den zu erwartenden geringen Konzentrationen im Spurenbereich ungünstig. Somit fiel die Wahl auf Glaskörper.

Ein Glasgefäß hat den Vorteil, dass es aufgrund des starren Aufbaus stets ein definiertes Volumen beinhaltet. Mit Substanzverlust oder -eintrag durch das Glas hindurch ist nicht zu rechnen. Glaskörper können nach einer Probenahme gereinigt und anschließend wieder verwendet werden. Glas ist zwar relativ inert, Adsorptionen an der Glasinnenwand sind aber durchaus möglich. Darüber hinaus besteht Bruchgefahr, welche gegebenenfalls durch sich aufbauenden Unter- oder Überdruck verstärkt werden kann.

Da in der Gasanalytik Gassammelrohre aus Glas verbreitet sind [160-162], wurden diese für die weiteren Versuche verwendet. Als Volumen wurde 1 L festgelegt. Dies sollte genug Probenmaterial sein, um durch HS-SPME-GC-MS-Analytik die VOC im Spurenbereich quantitativ untersuchen zu können.

Die im Handel erhältlichen Gassammelrohre besaßen beidseitig je einen Teflonhahn und ein Stück glattes Glasrohr. An der Außenseite auf Höhe der Mitte des Glaskörpers befand sich ein seitlicher Ansatz mit einem zylindrischen Halbloch-Septum. Diese Gassammelrohre wurden nun für die Bedürfnisse der Atemluftuntersuchung modifiziert. Die seitlichen glatten Glasrohre wurden durch GL14-Gewinde ersetzt. Damit bestand die Möglichkeit, einen Gasschlauch dicht anzuschließen, über den das Spülen des Gassammelrohres mit synthetischer Luft möglich war. Ferner konnte auch ein Mundstück auf dieses Gewinde aufgeschraubt werden, so dass eine hygienische und sichere Probenahme ohne Risiko oraler Verletzungen durch Glasbruch gewährleistet werden konnte (vgl. auch Abbildung 40, Seite 54). Der mittlere Ansatz wurde ebenso durch ein GL14-Gewinde ersetzt. Dieses war mit GL14-Schraubkappen mit Apertur und Silikon/PTFE-Septum zu verschließen und erlaubte auf diese Weise das direkte Einbringen einer SPME-Faser (Abbildung 14).



Abbildung 14: HS-SPME-Extraktion in einem Gassammelrohr

Wesentliche Grundlage für eine reproduzierbare Probenahme und die Wiederverwendbarkeit der Probenahmekörper war die vollständige Entfernung von gegebenenfalls vorhandenen VOC-Rückständen. Darüber hinaus musste die Sicherheit des Probengebers im Hinblick auf eine mögliche Krankheitsübertragung gewährleistet sein. Dazu diente ein eigens formuliertes Reinigungsprotokoll: Zunächst wurden die Glaskörper mit Wasser und Methanol mehrmalig gespült und anschließend bei 140 °C für mindestens 8 h getrocknet. Nach dem Reinigen folgte das Spülen der Gassammelrohre für 5 min mit ca. 300 mL·min⁻¹ synthetischer Luft. Demgegenüber wurden die Mundstücke entsprechend einer von der Charité freigegebenen Standardarbeitsanweisung gereinigt und desinfiziert (BAM-1.2-ALA-02, Seite A-81).

Als besondere Herausforderung erwies sich die reproduzierbare Einbringung von Standardsubstanzen. Der Einsatz gasförmiger Substanzen erschien zuerst naheliegend, allerdings hätte das Einbringen von zusätzlichem Gas in das Gassammelrohr zu einem Überdruck geführt. Dieser könnte zu Undichtigkeiten an den Hähnen oder dem Septum führen, womit ein eventueller Substanzverlust riskiert werden würde. Deswegen wurden alle Standards in leichtflüchtigem Methanol angesetzt und in geringer Menge bis 10 μL in gelöster Form in das mit synthetischer Luft gefüllte Gassammelrohr dotiert. Die sich anschließende Equilibrierzeit von 30 min sollte ein vollständiges Verdampfen der im Methanol gelösten Standardsubstanzen ermöglichen.

Auf Basis des mit synthetischer Luft gefüllten Gassammelrohres in Kombination mit dem methanolischen Standard konnten im Weiteren die SPME-Bedingungen für die Atemluftanalytik optimiert werden.

Optimierung der SPME-Bedingungen für die Atemluftanalytik in Gassammelrohren

Im Rahmen der Methodenentwicklung (vgl. Kapitel 3.1) war bereits die Car/PDMS-Faser als am besten geeignet für die VOC-Analytik ermittelt worden. Weiterführend war der beste Kompromiss aus Extraktionszeit und Extraktionstemperatur für die Atemluftanalytik zu bestimmen. Dafür wurden Gassammelrohre mit feuchter, synthetischer Luft gefüllt und n-Aldehyde der Kettenlänge C_5 - C_{10} als Zielsubstanzen eingebracht (vgl. Anhang Tabelle 15, Seite A-10). Die Auswahl der Aldehyde beruhte auf der wiederholten Nennung dieser Substanzklasse als potentielle Lungenkrebsmarker in der Literatur (vgl. Kapitel 2.2).

Zunächst erfolgte der Vergleich von drei verschiedenen Extraktionstemperaturen (30, 45 und 60 $^{\circ}\text{C}$) bei konstanter Extraktionszeit. Höhere Temperaturen wurden nicht getestet, weil dabei eine mögliche Oxidation der Aldehyde befürchtet wurde. Die Temperierung der Gassammelrohre erfolgte im Trockenschrank. In Abbildung 15 sind für die untersuchten n-Aldehyde die ermittelten Signalflächen bei verschiedenen Extraktionstemperaturen dargestellt. Dabei zeigte sich mit zunehmender Temperatur eine Zunahme für alle Substanzen. Folglich war eine Extraktionstemperatur von 60 $^{\circ}\text{C}$ am günstigsten.

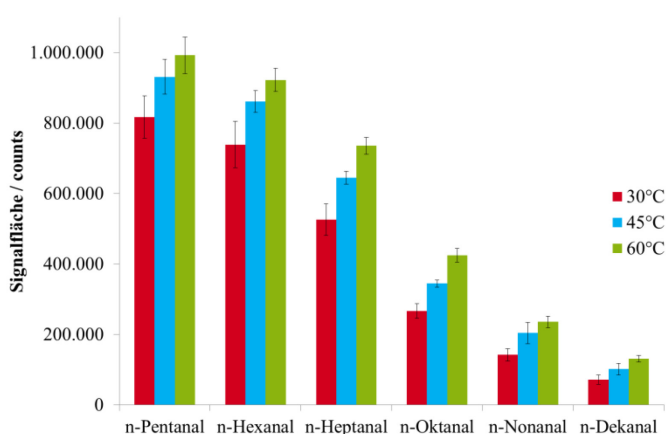


Abbildung 15: Einfluss der Extraktionstemperatur auf die ermittelten Signalflächen von n-Aldehyden bei SPME mit Car/PDMS (75 μm) für 15 min mit anschließender GC-MS-Analyse (Mittelwert und Standardabweichung, $n=3$)

Im nächsten Schritt wurde die Extraktionszeit unter Beibehaltung einer Extraktionstemperatur von 60 $^{\circ}\text{C}$ im Bereich von 5 min bis 60 min variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Mit ansteigender Zeit konnten höhere Signalintensitäten für alle n-Aldehyde erreicht werden. Folglich wäre eine Extraktionszeit von 60 min bei einer Temperatur von 60 $^{\circ}\text{C}$ am günstigsten.

Da sich das Platzieren des Gassammelrohres mit der SPME im Trockenschrank während der Extraktion als unpraktikabel erwies, wurde zusätzlich eine Extraktion für 60 min bei Raumtemperatur getestet. Im Vergleich zur Extraktion bei 60 $^{\circ}\text{C}$ mit gleicher Dauer konnten für n-Pentanal und n-Hexanal höhere Signalintensitäten beobachtet werden, während die Aldehyde mit einer Kettenlänge C_8 - C_{10} geringere Wiederfindungen zeigten. Insgesamt ergaben sich mit dieser Parameterkombination

nahezu gleich hohe Analysenwerte, so dass als bester Kompromiss zwischen Effektivität und Aufwand im Weiteren die Extraktion mit Car/PDMS-Faser (75 μm) bei Raumtemperatur für 60 min zur Anwendung kam.

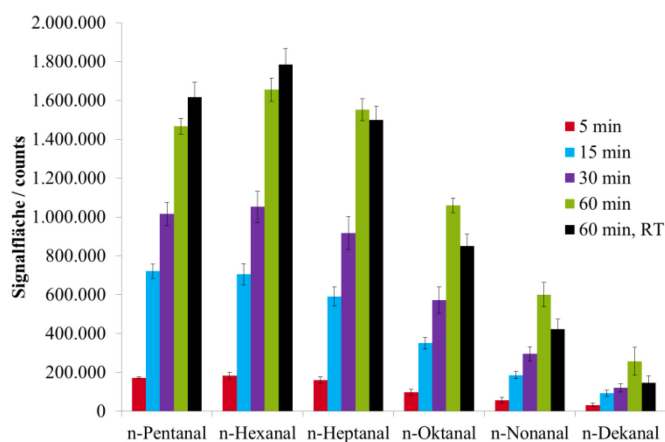


Abbildung 16: Einfluss der Extraktionszeit auf die ermittelten Signalflächen von n-Aldehyden bei SPME mit Car/PDMS (75 μm) bei 60 °C sowie für 60 min bei Raumtemperatur (RT) mit anschließender GC-MS-Analyse (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Angefeuchtete Modellluft

In realen Versuchen zur Beatmung eines Gassammelrohres zeigte sich durchweg ein Niederschlag der Atemfeuchte auf der Glasinnenseite. Im Vergleich zur bisher eingesetzten trockenen Luft war damit zu rechnen, dass die Atemfeuchtigkeit die Extraktionseffizienz der SPME beeinflusst. Darum erfolgte zur Vervollständigung des Modells die Verwendung angefeuchteter, synthetischer Luft. Dazu strömte die trockene Luft durch mit Wasser gefüllte Gaswaschflaschen. Mit einer verlängerten Spülzeit von 30 min ließ sich eine relative Luftfeuchtigkeit von 84-89 % (n=3) einstellen. Vergleichsuntersuchungen mit realer Atemluft ergaben sehr ähnliche Werte (85-88 %).

Zur weiteren Verfeinerung des Modells wurden spezifische Matrix-VOC eingebracht: Isopren, Aceton und 2-Propanol. Alle drei Substanzen ließen sich mit hohen Signalintensitäten während des Screenings an Realproben nachweisen (Abbildung 48, Seite 75). Diese Substanzen mit hohen Konzentrationen in der Atemluft könnten die Extraktionseffizienz der SPME für die anderen, nur in Spuren in den Proben enthaltenen VOC beeinflussen. Es ist anzumerken, dass für Isopren, welches ein Precursor in der Cholesterolsynthese ist [163-165], auch schon der Vorschlag als Lungenkrebsmarker erfolgte [66, 68]. 2-Propanol ist gängig in Desinfektionsmitteln und kommt deswegen ubiquitär in Kliniken [84] vor, wurde jedoch auch schon als Lungenkrebsmarker diskutiert [76]. Der Atemacetongehalt steht in Zusammenhang mit dem Gehalt des Ketokörpers β -Hydroxybutyrat im Blut und dem Blutzuckerwert [58] sowie dem Hungerzustand [166]; seine Eignung als Diabetesmarker wurde untersucht [167].

Damit lag nun eine deutlich stärker der Realität entsprechende Modellluft für die Kalibrierung zur quantitativen Untersuchung realer Atemproben vor.

Kalibrierung für die VOC-Atemluftanalytik in Gassammelrohren

Für die Kalibrierung wurden 24 Ziel-VOC (zur Auswahl siehe Kapitel 3.4.2 und Kapitel 4.2.1) und drei Matrixsubstanzen in einer methanolischen Stammlösung gemischt und daraus zunächst sieben Standardlösungen mit einem Konzentrationsbereich 1:20 verdünnt. Nach ersten quantitativen Untersuchungen an Realproben wurde dieser Arbeitsbereich nach oben erweitert, weil die detektierten Signalintensitäten einiger VOC in einigen Proben deutlich über dem höchsten Konzentrationsniveau lagen. Aus diesem Grund wurde die Herstellung der Standardlösungen für die Kalibrierung in der Weise abgeändert, dass nun nicht sieben, sondern neun Standardlösungen mit einem erweiterten Arbeitsbereich 1:70 erzeugt wurden. Ein Beispiel für die Konzentrationen einer solchen Standardreihe mit neun Lösungen ist dem Anhang Tabelle 16 (Seite A-11) zu entnehmen. Die daraus resultierenden VOC-Konzentrationen in dem Gassammelrohr sind in Tabelle 8 angegeben. Aufgrund der nachträglichen Erweiterung des Kalibrierbereiches folgte, dass die beiden hohen Konzentrationsniveaus

dazu kamen, ohne dass die Konzentrationsverteilung der Standardlösungen mit niedriger Konzentration geändert wurde.

Die Standardlösungen für die Kalibrierung wurden in Gassammelrohre, die bereits angefeuchtete synthetische Luft enthielten, eingebracht. Nach Equilibrierung erfolgte die HS-SPME-GC-MS-Analytik mit den optimierten SPME-Extraktionsbedingungen (1 h bei Raumtemperatur) und den GC-Parametern, die aus der zweiten Optimierung hervorgegangen waren. Die MS-Detektion erfolgte parallel zur Scan-Methode auch im SIM-Modus (Anhang Tabelle 17, Seite A-12), um die Empfindlichkeit der Analyse für die Zielsubstanzen zu erhöhen.

Die Auswertung für die Analysen zur Kalibrierung ist in Kapitel 4.2.2 dargestellt. Nachdem die Kalibrierung erfolgreich durchgeführt worden war, konnten Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt werden.

Tabelle 8: VOC-Gehalt in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in Gassammelrohren mit angefeuchteter, standarddotierter Modellluft für die Kalibrierung

Substanz	Konzentrationsniveau								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n-Pentan	0,61	1,22	2,67	5,27	7,95	10,8	14,1	29,2	42,8
n-Hexan	0,28	0,55	1,20	2,37	3,58	4,86	6,35	13,1	19,3
n-Heptan	0,09	0,18	0,40	0,78	1,18	1,60	2,09	4,33	6,36
n-Oktan	0,18	0,35	0,78	1,53	2,31	3,14	4,10	8,49	12,5
n-Nonan	0,22	0,45	0,98	1,93	2,91	3,95	5,16	10,7	15,7
n-Dodekan	0,26	0,52	1,13	2,23	3,36	4,57	5,96	12,3	18,1
2-Methylpentan	0,34	0,67	1,46	2,88	4,35	5,91	7,71	16,0	23,4
3-Methylpentan	0,16	0,33	0,72	1,42	2,14	2,90	3,79	7,84	11,5
Cyclohexan	0,10	0,21	0,45	0,90	1,35	1,84	2,40	4,96	7,28
Methylcyclopentan	0,10	0,20	0,44	0,87	1,31	1,78	2,32	4,81	7,05
Benzen	0,33	0,67	1,46	2,88	4,34	5,89	7,69	15,9	23,4
Ethylbenzen	0,12	0,24	0,52	1,02	1,53	2,08	2,72	5,62	8,25
n-Propylbenzen	0,04	0,07	0,16	0,32	0,48	0,65	0,85	1,76	2,58
Propanal	2,34	4,67	10,2	20,2	30,4	41,3	54,0	112	164
n-Butanal	0,25	0,50	1,10	2,17	3,28	4,45	5,81	12,0	17,6
n-Pentanal	0,26	0,52	1,13	2,23	3,36	4,57	5,96	12,3	18,1
n-Hexanal	0,27	0,53	1,16	2,28	3,45	4,68	6,11	12,6	18,5
n-Heptanal	0,27	0,54	1,19	2,34	3,53	4,79	6,26	13,0	19,0
n-Oktanal	0,35	0,70	1,53	3,02	4,55	6,19	8,07	16,7	24,5
n-Nonanal	0,28	0,55	1,20	2,37	3,57	4,85	6,33	13,1	19,2
n-Dekanal	0,28	0,56	1,22	2,41	3,64	4,95	6,46	13,4	19,6
1-Butanol	0,32	0,64	1,40	2,77	4,17	5,67	7,40	15,3	22,5
2-Butanon	1,61	3,21	7,03	13,9	20,9	28,4	37,1	76,8	113
2-Pentanon	1,07	2,13	4,66	9,20	13,9	18,8	24,6	50,9	74,7
2-Propanol	240	480	1060	2090	3150	4280	5590	11570	16960
Aceton	470	930	2050	4040	6090	8280	10800	22360	32780
Isopren	30,6	60,9	130	260	400	540	700	1460	2140

Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der VOC-Atemluftanalytik in Gassammelrohren

Für die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden ebenso methanolische Standardlösungen mit den 24 Zielsubstanzen und drei Matrix-VOC hergestellt. Allerdings wurde ein niedrigerer Konzentrationsbereich von 1:10 realisiert und auf äquidistanten Konzentrationsabstand der sechs Standardlösungen geachtet (Anhang Tabelle 18, Seite A-12). Anschließend wurden analog zur Kalibrierung Gassammelrohre mit diesen Standards vorbereitet (Tabelle 9) und mit HS-SPME-GC-

MS analysiert. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die 24 Zielsubstanzen wurden mit der in dem Programm „Statist“ implementierten Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 abgeschätzt. Die erhaltenen Kenndaten sind in Kapitel 4.2.2 aufgeführt und bewertet.

Im Weiteren war zu prüfen, wie lange einmal hergestellte Standardlösungen einsetzbar waren.

Tabelle 9: VOC-Gehalt in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in Gassammelrohren mit angefeuchteter, standarddotierter Modellluft für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Substanz	Konzentrationsniveau					
	NWG 1	NWG 2	NWG 3	NWG 4	NWG 5	NWG 6
n-Pentan	0,68	2,13	3,68	5,24	6,71	8,11
n-Hexan	0,28	0,89	1,53	2,18	2,79	3,37
n-Heptan	0,11	0,33	0,57	0,81	1,04	1,26
n-Oktan	0,19	0,60	1,04	1,48	1,90	2,30
n-Nonan	0,29	0,90	1,55	2,20	2,82	3,41
n-Dodekan	0,25	0,78	1,35	1,92	2,46	2,97
2-Methylpentan	0,35	1,08	1,86	2,64	3,39	4,09
3-Methylpentan	0,18	0,55	0,94	1,34	1,72	2,07
Cyclohexan	0,12	0,37	0,63	0,90	1,16	1,40
Methylcyclopentan	0,11	0,36	0,61	0,88	1,12	1,36
Benzen	0,34	1,06	1,82	2,59	3,32	4,01
Ethylbenzen	0,13	0,42	0,72	1,02	1,30	1,58
n-Propylbenzen	0,04	0,13	0,23	0,32	0,42	0,50
Propanal	2,55	7,96	13,7	19,5	25,0	30,2
n-Butanal	0,29	0,91	1,56	2,22	2,85	3,44
n-Pentanal	0,30	0,94	1,61	2,30	2,94	3,56
n-Hexanal	0,29	0,91	1,58	2,24	2,87	3,47
n-Heptanal	0,30	0,93	1,60	2,28	2,92	3,53
n-Oktanal	0,31	0,98	1,68	2,40	3,07	3,71
n-Nonanal	0,31	0,96	1,65	2,36	3,02	3,65
n-Dekanal	0,34	1,05	1,81	2,57	3,30	3,98
1-Butanol	0,35	1,09	1,88	2,68	3,43	4,15
2-Butanon	1,75	5,47	9,42	13,41	17,2	20,8
2-Pentanon	1,18	3,69	6,36	9,05	11,6	14,0
2-Propanol	210	660	1140	1620	2070	2510
Aceton	420	1320	2280	3250	4160	5020
Isopren	26,0	81,0	140	200	250	310

Standardstabilität und Lebensdauer von SPME-Fasern

Parallel zum Beginn der Untersuchungen realer Atemluftproben wurde die Stabilität der verwendeten Standardlösung über einen Zeitraum von 12 Wochen geprüft, indem die alten Standardlösungen mit frisch hergestellten verglichen wurden. Die erhaltenen Signalintensitäten der frisch hergestellten Standardlösungen waren jedoch nicht höher, als die der ursprünglichen (Abbildung 17). Davon ausgehend konnte geschlussfolgert werden, dass die hergestellten Standardlösungen über einen Zeitraum von drei Monaten verwendet werden konnten.

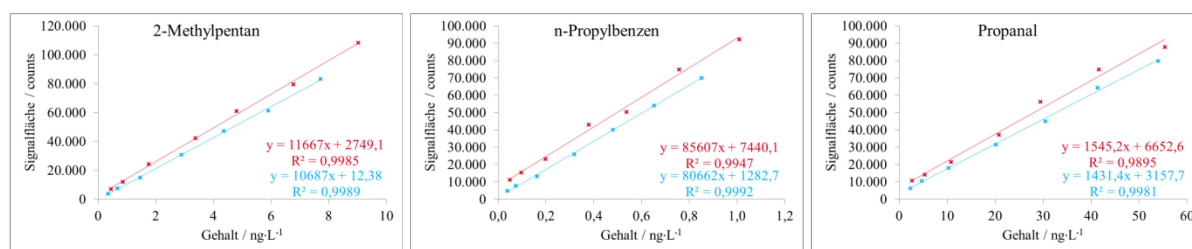


Abbildung 17: Überprüfung der Stabilität von Standardgemischen mit Zielsubstanzen für die Untersuchung realer Atemluftproben durch Vergleich von 12 Wochen alten Standardlösungen (rot) mit frisch hergestellten (blau) unter Einsatz von SPME-GC-MS

Ferner wurden arbeitstäglich zwei Standardlösungen (Konzentrationsniveau Nr. 2 und Nr. 6) als Qualitätskontrollanalysen untersucht. Dadurch konnte ein abnehmender Trend der Signalintensitäten mit zunehmender Benutzung der SPME-Faser festgestellt werden (Abbildung 18). Nach 100 Injektionen wurden nur noch ca. 50 % der ursprünglichen Intensität erreicht. Folglich waren die SPME-Fasern nach ca. 100 Injektionen zu tauschen.

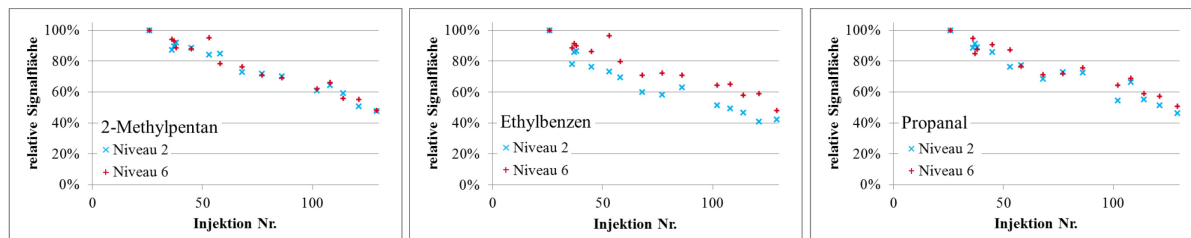


Abbildung 18: Ergebnisse der arbeitstäglichen Untersuchungen eines VOC-Standardgemisches in zwei verschiedenen Konzentrationsniveaus mittels SPME-GC-MS mit einer SPME-Faser für drei VOC (Qualitätskontrollanalysen); die Signalintensität der Injektion Nr. 26 wurde als Bezugspunkt auf 100 % normiert

Abschließend war noch der Einfluss einer Probenlagerung auf das VOC-Profil zu untersuchen.

Lagerung von Gassammelrohren mit feuchter Modellluft und VOC-haltigem Standardgemisch

Aufgrund der Aufgabenteilung im Rahmen der Studie (vgl. Kapitel 3.4) zwischen den Klinikmitarbeitern, die vor Ort die Probenahme durchführten, und den BAM-Mitarbeitern, die in den BAM-Laboratorien die HS-SPME-GC-MS-Analytik vornahmen, ergaben sich Probenstandzeiten von ein bis drei Tagen für die Atemluftproben. Aus diesem Grund wurde das entwickelte Modellsystem mit feuchter synthetischer Luft angewendet, um den Einfluss einer Probenlagerung von bis zu vier Tagen auf das VOC-Profil zu untersuchen. Dafür wurden am ersten Arbeitstag 15 Gassammelrohre mit nativem Standard mit 24 Zielsubstanzen und drei Matrix-VOC (Tabelle 8, Seite 31, Konzentrationsniveau Nr. 7) dotiert. ber eine Arbeitswoche wurden jeden Tag drei vorbereitete Proben nach Zusatz eines internen Standards (Anhang Tabelle 19, Seite A-13) mit HS-SPME-GC-MS analysiert. Eine Auswertung des Versuches findet sich in Kapitel 4.2.2.

Zusammenfassung

Es wurde ein modifiziertes Gassammelrohr mit einem Volumen von 1 L für die Atemluftprobenahme ausgewählt. Darin erfolgte die Einbringung von angefeuchteter, synthetischer Luft als Modellgas, welche für erste Untersuchungen mit einem VOC-haltigen Standard auf Methanolbasis dotiert wurde. Als geeignete SPME-Extraktionsbedingungen wurde unter Einsatz der Car/PDMS-Faser eine Extraktionszeit von 60 min bei Raumtemperatur ermittelt. Ferner konnte die Methode kalibriert, Qualitätskontrollanalysen durchgeführt und ein Lagerungseinfluss auf das VOC-Profil dieses Modellsystems untersucht werden.

In dem nächsten Unterkapitel werden Modelluntersuchungen mit einem weiteren Probenahmekörper beschrieben.

3.2.2 Adsorbervliesgefüllte Probenahmeröhrchen

Ein Teil der BIOAIR-Studie befasste sich mit der Lungenkrebserkennung durch speziell trainierte Hunde. Diese Fähigkeit der Hunde zur Unterscheidung von Atemluftproben von Lungenkrebskranken und Gesunden wurde bereits in mehreren Proof-of-Principle-Studien belegt [76, 133, 168-171]. Dabei erfolgte der Einsatz verschiedener Probenahmekörper, die als zentrale Komponente Trägermaterialien enthielten (Tabelle 10). Die instrumentell-analytische Untersuchung solcher Probenahmeröhrchen und damit genommener Atemluftproben könnte ein weiterer Weg sein, um potentielle Biomarker zu identifizieren. Deswegen kamen nicht nur Gassammelrohre für die Probenahme von Atemluft zum Einsatz, sondern auch vliesgefllte Probenahmeröhrchen.

Tabelle 10: Literaturübersicht zu Proof-of-Principle-Studien zur Lungenkrebserkennung mit trainierten Hunden

Literaturstelle	Trägermaterial für Atemproben	Sensitivität	Spezifität
McCulloch <i>et al.</i> (2006) [168]	PP-Röhrchen mit silikonölmodifizierter PP-Wolle	99 %	99 %
Buszewski <i>et al.</i> (2012) [76]	PP-Röhrchen mit herausnehmbarer Einlage	82 %	82 %
Ehmann <i>et al.</i> (2012) [169]	Glasröhrchen mit silikonölmodifizierten PP-Vliesen	71 %	93 %
Walczak <i>et al.</i> (2012) [170]	PP-Röhrchen mit Einlage aus Baumwolle	ca. 50 %	ca. 80 %
Amundsen <i>et al.</i> (2014) [171]	sterile Exhalationsfilter	56-74 %	8-33 %
Rudnicka <i>et al.</i> (2014) [133]	PP-Röhrchen mit ölgetränktem PP-Absorber	86 %	72 %

PP: Polypropylen

Konfektionierung von Probenahmeröhrchen mit Vliesen

Ein mitwirkender Arzt in der Studie besaß bereits Erfahrung aus einem Projekt, in dem Hunde mit Atemluft zur Erkennung von Lungenkrebs trainiert worden waren. Er stellte für die BIOAIR-Studie mehrere Muster der Probenahmekörper, die in der Studie von Ehmann *et al.* [169] verwendet worden waren, zur Verfügung (Abbildung 19). Dabei handelte es sich um Glasrohre, welche einfache Gummistopfen als Verschluss besaßen und mit zwei ineinander gerollten Vliesen – hydrophob und hydrophil modifiziertes Polypropylen – gefüllt waren. Die Vliese sind dabei das zentrale Element dieser Röhrchen, da sie eine Adsorptionswirkung besitzen und somit beim Beatmen Substanzen aus der Atemluft anreichern sollten.

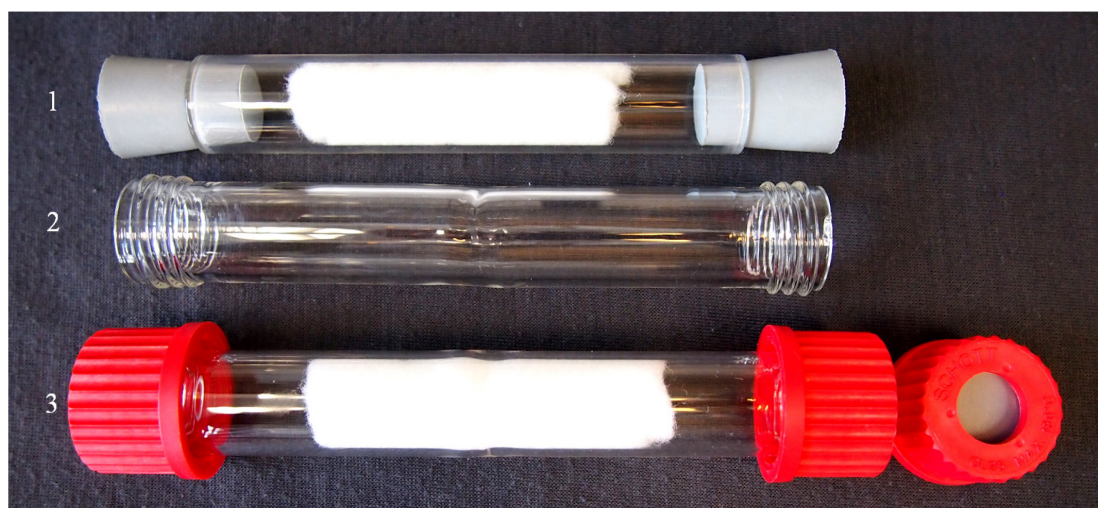


Abbildung 19: Glasrohre mit Adsorbervliesen; 1: Musterexemplar, 2: modifiziertes Gewinderöhr, 3: Gewinderöhr mit Lochkappe und Septum

Zunächst wurde das Verschlussmaterial ersetzt, weil die Dichtigkeit bezweifelt wurde und die Gummistopfen selbst VOC freisetzen könnten. Das Glasrohr wurde durch Rohre mit beidseitigem GL25-Gewinde ersetzt und Schraubkappen als Verschluss eingeführt (Abbildung 19). Damit war auch die Möglichkeit einer gleichzeitigen Adaption eines Mundstücks und eines Spirometers zur Volumenkontrolle (vgl. auch Abbildung 40, Seite 54) gegeben. Je nach Verwendungsbestimmung der Röhrchen konnten Vollkappen mit enthaltenem PTFE-Septum zum Einsatz kommen oder Kappen mit Apertur. Es gab Kappen in zwei verschiedenen Farben: rote Kappen für positive Proben (Atemluft von Lungenkrebspatienten), und schwarze Kappen für negative Proben (Atemluft von Gesunden) und Blindproben. In die Kappen mit Apertur wurde ein Septum eingebracht, um eine direkte Anreicherung durch SPME zu ermöglichen (Abbildung 20). Dabei kamen zunächst Silikonsepten zum Einsatz. Diese stellten sich jedoch als undicht heraus (siehe Seite 36), so dass später Silikon/PTFE-Septen verwendet wurden.



Abbildung 20: HS-SPME-Extraktion in einem Probenahmeröhrchen.

Die Vliese aus den Musterexemplaren wiesen alle unterschiedlichen Größen auf. Da jedoch für analytische Untersuchungen reproduzierbare Proben eine Voraussetzung sind, sollten die Abmessungen der Vliese zukünftig gleich gestaltet sein. Dafür wurden spezielle Stanzwerkzeuge zum Zurechtschneiden in der hauseigenen Werkstatt angefertigt. Die zwei Stanzwerkzeuge unterschieden sich in ihrer Geometrie an den Ecken, so dass die unterschiedlich modifizierten Vliese nach dem Stanzen differenziert werden konnten. Das hydrophile Vlies erhielt spitze Ecken und das hydrophobe Vlies abgerundete Ecken (Abbildung 21). Das Stanzen der Vliese erfolgte in einem Labor, in dem nicht mit organischen Lösungsmitteln gearbeitet wurde, um das Kontaminationsrisiko zu reduzieren. Die Vliese wurden bis zur Verwendung getrennt in Weithals-Schliffflaschen gelagert.

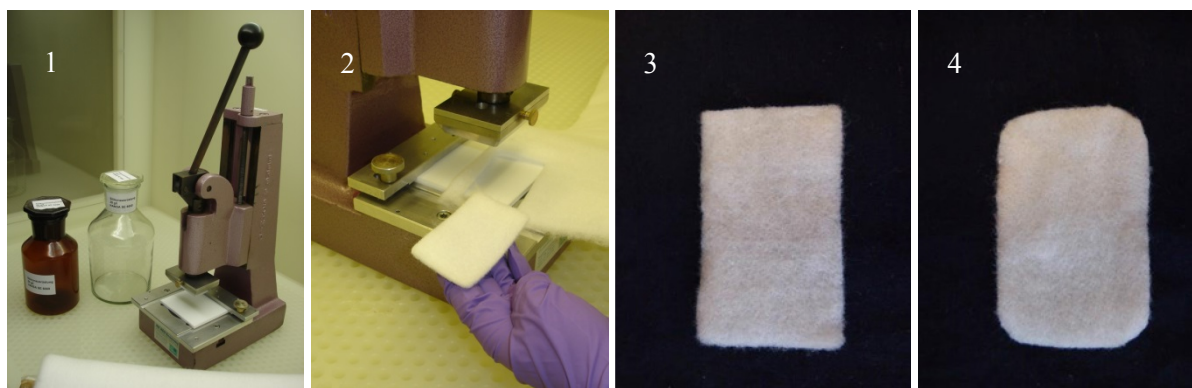


Abbildung 21: Stanzen von Adsorbervliesen; 1: Stanzgerät, Vliesballen und Aufbewahrungsflaschen, 2: ausgestanztes Vlies, 3: hydrophiles Vlies mit spitzen Ecken, 4: hydrophobes Vlies mit abgerundeten Ecken

Bei der Konfektionierung der Probenahmeröhrchen waren stets Handschuhe zu tragen. Vor der Verwendung der Glasrohre erfolgte eine Reinigung durch Spülen mit entionisiertem Wasser, Spülen mit Methanol und Trocknen für mindestens 8 h bei 140 °C. Beim Befüllen wurden ein hydrophiles und ein hydrophobes Vlies aufeinandergelegt und der Länge nach eingerollt, so dass das hydrophile Vlies außen zum Liegen kam. Anschließend erfolgten das mittige Positionieren der eingerollten Vliese in dem Glasrohr und der Verschluss mit Schraubkappen.

Untersuchungen zur Grundbelastung der Vliese

Für das Befüllen der Probenahmeröhrchen standen mit asota[®] olefin-Ausrüstung modifizierte Polypropylenvliese, jeweils mit hydrophiler und hydrophober Belegung, zur Verfügung. Um eine Vorstellung von den in diesen modifizierten Polypropylenmaterialien enthaltenen VOC zu erhalten, wurde die Grundbelastung mit HS-SPME-GC-MS analysiert. Die entsprechenden Chromatogramme sind im Anhang Abbildung 2 (Seite A-15) dargestellt.

Die Vliese wiesen eine deutliche Grundbelastung mit VOC verschiedener chemischer Substanzklassen auf: Alkohole, Aldehyde, Ketone, Alkene und Aromaten. Zwischen den beiden Vliestypen konnten auch Unterschiede beobachtet werden: Im hydrophoben Vlies waren mehr Alkane

zu detektieren, während das hydrophile Vlies deutlich höhere Signalintensitäten für organische Säuren aufwies.

Reinigungsversuch von Probenahmeröhrchen

Aufgrund der festgestellten hohen Grundbelastung der Vliese ergab sich die Frage, ob nicht eine Reinigung zur Reduktion des Hintergrundes möglich wäre. Dafür wurden gefüllte Probenahmeröhrchen für 10 min mit synthetischer Luft mit ca. $11,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ gespült. Es erfolgte die Durchführung von vergleichenden HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen von ungespülten und gespülten Röhrchen. Diese Analysen wurden für die olefin-modifizierten Vliese vorgenommen. Ausgewählte Chromatogramme sind in Anhang Abbildung 3 (Seite A-16) zu finden.

Durch das Spülen erfolgte eine Reduktion der Signalintensitäten für organische Säuren, Alkohole und Ketone in den gespülten Röhrchen, während Aldehyde unbeeinflusst blieben. Einige Signale zeigten sogar eine Intensitätssteigerung durch das Spülen wie z. B. 2-Propanol, was mit einer Kontamination durch Laborluft in Zusammenhang stehen könnte. Das Spülen der Probenahmeröhrchen wurde nicht als Vorbehandlungsschritt etabliert. Für diese Entscheidung war im Wesentlichen das nicht auszuschließende Kontaminationsrisiko maßgeblich.

Lagerversuch von Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septum

In der Studie von Ehmann *et al.* [169] wurden die Atemluftproben in den Probenahmeröhrchen zum Teil noch nach einer Lagerzeit von 60 Tagen erfolgreich für die Erkennung durch Hunde eingesetzt. Deswegen war es interessant zu untersuchen, wie sich eine Lagerung auf das VOC-Profil von mit Standard dotierten Probenahmeröhrchen auswirkt. Dafür wurde in Probenahmeröhrchen mit olefin-modifizierten Vliesen und Schraubkappen mit Apertur und Silikon-Septen Standardlösung mit 24 Ziel- und drei Matrixsubstanzen dotiert und anschließend bis zu 24 Wochen im Dunklen bei Raumtemperatur und im Kühlschrank gelagert.

Bei beiden Lagertemperaturen ist eine starke Veränderung des VOC-Profiles bereits nach einer Woche ersichtlich. Bei Raumtemperatur (Abbildung 22) ist für die Alkane mehrheitlich ein Anstieg auf mehr als das Zehnfache zu erkennen. Demgegenüber wurden für Isopren, Aceton und 2-Propanol, die als Matrixsubstanzen mit sehr hohen Konzentrationen in das Probenahmeröhrchen appliziert wurden, starke Signalabnahmen bis unter 1 % vom Ausgangswert beobachtet.

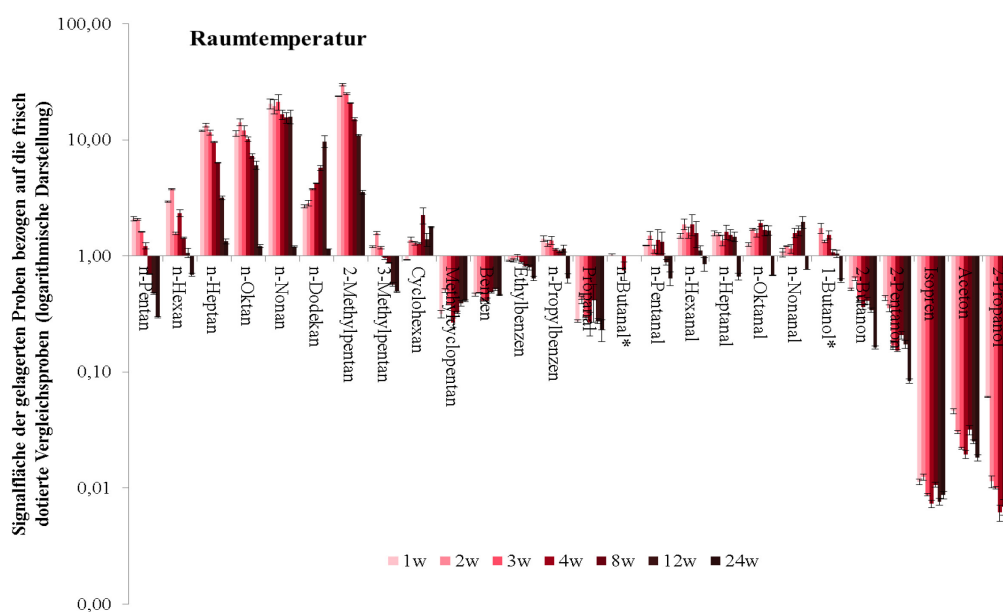


Abbildung 22: Veränderung des VOC-Profiles in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen bei Raumtemperatur über 24 Wochen; dargestellt ist das Verhältnis der Signallflächen (HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen) der VOC in den gelagerten Proben zu frisch dotierten Vergleichsproben (Mittelwert und Standardabweichung, $n=2$) in logarithmischer Auftragung; *: nicht alle Datensätze auswertbar aufgrund von Koelution

Bei gekühlter Lagerung (Anhang Abbildung 4, Seite A-17) findet diese Gehaltsabnahme verzögert und für Aceton und 2-Propanol in deutlich geringerem Umfang statt.

In einem zusätzlichen Versuch wurde getestet, wie sich die angewendete Equilibrierzeit von einem Tag, die eine Gleichgewichtseinstellung zwischen dotiertem Standard und Vlies gewährleisten sollte, auf die Signalintensitäten auswirkte. Außerdem wurde der Einfluss der Vliese betrachtet, indem zusätzlich Standard in Glasröhrchen ohne Vliese dotiert wurde. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass bereits innerhalb der ersten 24 h deutliche Veränderungen im VOC-Profil zu beobachten waren.

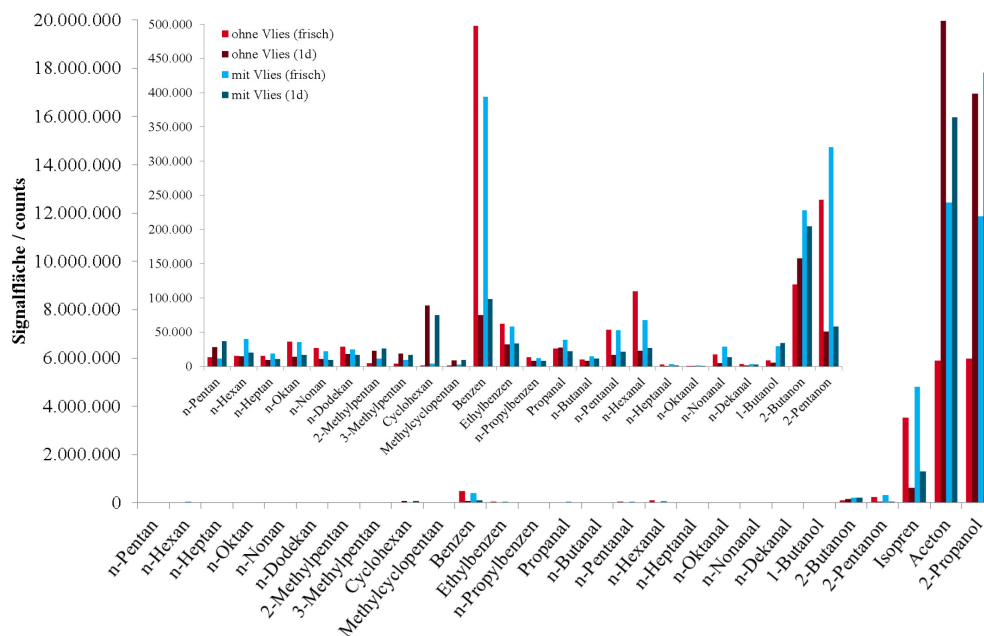


Abbildung 23: HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen zum Einfluss der Equilibrierzeit (1 d) und des Vlieses auf das VOC-Profil in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen; Ausschnitt: Darstellung ohne Matrixsubstanzen

Unter anderem für Isopren und die Aromaten trat während des ersten Tages eine Signalabnahme auf, während für Aceton, 2-Propanol und weitere kurzkettige Verbindungen eine Signalerhöhung beobachtet werden konnte. Diese Trends sind nicht nur für das Probenahmeröhrchen mit Vlies zu erkennen, sondern auch für die Glasrohre ohne Vlies. Wahrscheinlich war nicht das Vlies für die Veränderung des VOC-Profiles verantwortlich, sondern der verwendete Verschluss der Probenahmeröhrchen hielt nicht dicht bzw. ermöglichte Migration. Damit konnte ein Austausch zwischen dem Inneren der Probenahmeröhrchen und der Umgebung stattfinden. Damit war es notwendig, einen Ersatz für die ungeeigneten Silikon-Septen zu finden.

Lagerversuch mit Probenahmeröhrchen mit Silikon/PTFE-Septen

Silikon/PTFE-Septen könnten einen Ersatz für die bisher in den Probenahmeröhrchen eingesetzten, ungeeigneten Silikon-Septen sein. Dazu wurde ein zweiter Lagerversuch über einen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt (Abbildung 24). Im Vergleich zum vorhergehenden Versuch ist zu erkennen, dass die VOC-Gehalte bei Anwendung der Silikon/PTFE-Septen deutlich stabiler waren. Die meisten Gehalte in den gelagerten Proben bewegten sich zwischen 50 % und 300 % im Vergleich zu den frisch dotierten Proben. Einzige Ausnahme ist 1-Butanol: für diese Substanz konnten für bei Raumtemperatur gelagerte Proben deutlich erhöhte Gehalte beobachtet werden; die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Im Weiteren wurden die Silikon/PTFE-Septen für die Probenahmeröhrchen verwendet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Probenahmeröhrchen trotz verbesserter Septen immer noch einen Austausch zwischen dem Inneren des Röhrchens und der Umgebung zuließen. Von daher sind Atemluftproben, die mit den Probenahmeröhrchen genommen werden, möglichst ohne lange Zwischenlagerung zu untersuchen.

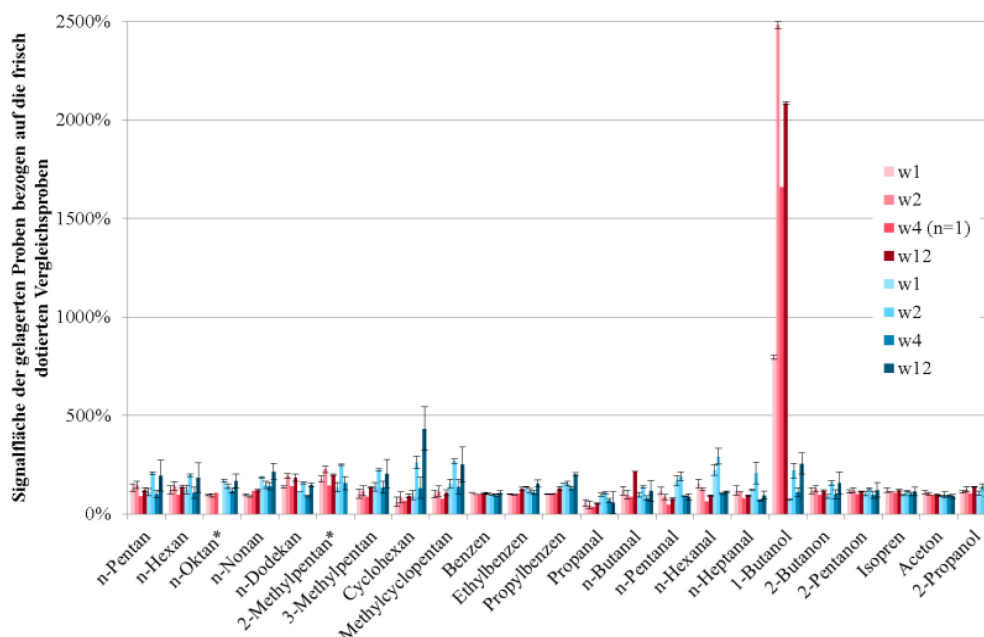


Abbildung 24: Veränderung des VOC-Profiles in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon/PTFE-Septen bei Raumtemperatur (rot) oder 6 °C (blau) über 12 Wochen; dargestellt ist das Verhältnis der Signalfächen (HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen) der VOC in den gelagerten Proben zu frisch dotierten Proben (Mittelwert und Standardabweichung, $n=2$). *: nicht alle Daten auswertbar, Aldehyde C_8 - C_{10} nicht dargestellt, da weitestgehend nicht auswertbar

Untersuchung der Adsorptionsfähigkeit der Probenahmeröhrchen für die Zielsubstanzen

Eine zentrale Frage war, welche der Ziel-VOC durch das Vlies aus der Luft adsorbiert werden. Für diese Untersuchung wurde das Atemluftmodell (siehe Kapitel 3.2.1) angewendet. Mit angefeuchteter Modellluft gefüllte und standarddotierte Gassammelrohre wurden an Probenahmeröhrchen adaptiert und die Luft aus dem Gassammelrohr in die Probenahmeröhrchen überspült. Substanzen, die gegebenenfalls nicht an dem Vlies adsorbierten, sollten auf einem nachgeschalteten Tenax TA-Röhrchen adsorbieren. Zum Vergleich wurde sowohl die Grundbelastung der Röhrchen erneut untersucht als auch Standard direkt in Probenahmeröhrchen dotiert. Bei diesem Versuch wurden die gleichen 24 Zielkomponenten wie in den Realproben untersucht, allerdings ohne Matrixsubstanzen, um eine Überladung des Adsorberröhrchens zu vermeiden.

Die Ergebnisse der SPME-GC-MS-Analytik des HS in den Probenahmeröhrchen sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Untersuchungen konnten für 19 der 24 Zielsubstanzen ausgewertet werden. Dabei ließen sich für n-Heptanal, n-Nonanal und n-Dodekan in den unbehandelten Probenahmeröhrchen vergleichbare Signalintensitäten wie in den standarddotierten und mit Standard überspülten Probenahmeröhrchen beobachten. Folglich ist für diese Substanzen die Hintergrundbelastung aus den Vliesen im Vergleich zur Menge des dotierten Standards zu hoch, so dass die Zugabe in die Probenahmeröhrchen keine relevante Änderung der detektierten Signalintensitäten bewirkt.

Substanzen, die im Probenahmeröhrchen mit überspültem Standard und mit direkt dotiertem Standard vergleichbare Intensitäten bei gleichzeitig niedriger Hintergrundbelastung aufwiesen, sind gut adsorbiert worden. Das traf für Propanal, 3-Methylpentan und 2-Butanon zu. Im Gegensatz dazu wurden Benzen, Ethylbenzen, n-Propylbenzen, n-Heptan, n-Oktan, n-Nonan, 2-Pentanon und n-Oktanal nicht im Probenahmeröhrchen zurückgehalten; hier waren die Intensitäten in den überspülten Proben auf Niveau der Hintergrundbelastung. Vor allem das unterschiedliche Verhalten von den Homologen 2-Butanon und 2-Pentanon ist auffallend, ohne dass dafür eine Erklärung ersichtlich war.

Die Ergebnisse für n-Pentan, Methylcyclopentan, n-Butanal, n-Hexanal und 1-Butanol waren schwierig zu interpretieren. Hierbei wiesen die Vergleichsanalysen mit direkt in die Vliese dotiertem

Standard eine der Hintergrundbelastung ähnliche Intensität auf, während in den überspülten Probenahmeröhrchen deutlich größere Signalfächen beobachtet werden konnten. Ein Blindwerteintrag durch nicht ausreichend gereinigte Gassammelrohre war für diese Substanzen unwahrscheinlich (Anhang Abbildung 5, Seite A-19). Koelutionen, die zu scheinbar erhöhten Signalintensitäten führen konnten, waren ebenso nicht zu beobachten. Gegebenenfalls lagen Matrixeinflüsse vor, welche die SPME-Extraktion beeinflussten. Zwar wurden alle drei Typen von Probenahmeröhrchen gleichermaßen mit Argon und feuchter Modellluft behandelt, jedoch gibt es Unterschiede für das Lösungsmittel Methanol: die Proben zur Erfassung der Hintergrundbelastung enthalten kein Methanol, bei den Vergleichsanalysen wurde das Lösungsmittel direkt in die Probenahmeröhrchen an einem Punkt dotiert und beim Überspülen des Standards war Methanol Bestandteil im Gasraum des Gassammelrohres, so dass das gesamte Vlies durch den Gasstrom mit Methanol benetzt worden sein könnte. Darüber hinaus könnte in der Vergleichsuntersuchung durch die Dotierung des Standards als ein Tropfen die Verteilung der Analyten in dem Probenahmeröhrchen anders gewesen sein, als durch die verdünnte Aufbringung im Gasstrom im Zusammenhang mit dem Überspülen. Allerdings ist bis jetzt keiner dieser Erklärungsversuche wirklich zufriedenstellend.

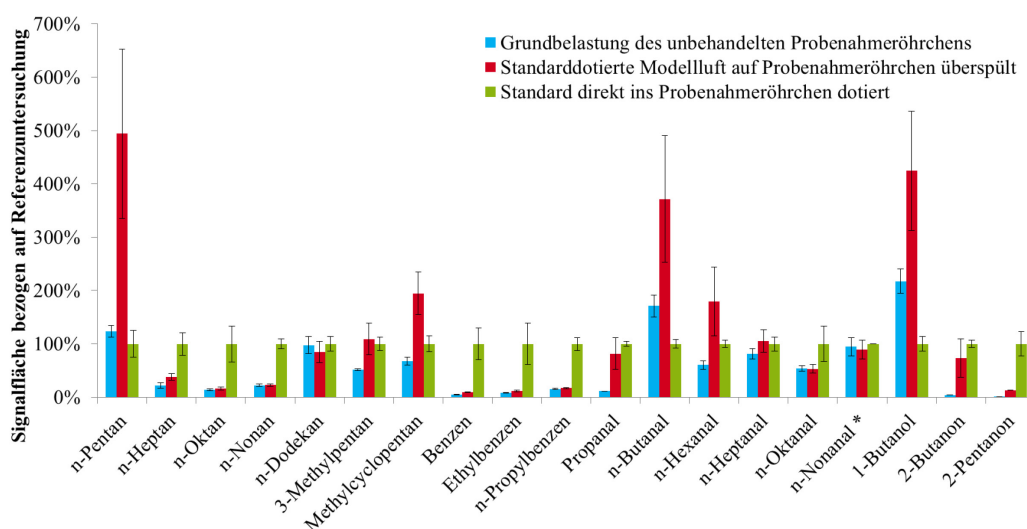


Abbildung 25: Wiederfindung von 19 Ziel-VOC in mit VOC-haltiger Modellluft überspülten Probenahmeröhrchen analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, $n=3$); blau: Hintergrundbelastung, rot: Probenahmeröhrchen, auf das standarddotierte Modellluft überspült wurde, grün: Probenahmeröhrchen mit direkt dotiertem Standard (Referenz); *: nicht alle Datensätze auswertbar aufgrund von Koelution

Die Analyse der den Probenahmeröhrchen nachgeschalteten Tenax TA-Röhrchen sollte ergänzende Informationen darüber liefern, welche der Zielsubstanzen beim Überspülen nicht in den Probenahmeröhrchen verblieben. Bei diesen Untersuchungen konnten deutlich weniger Signale ausgewertet werden als bei der HS-SPME-GC-MS-Analytik der Probenahmeröhrchen. Dies lag zum einen an der fehlenden Retention der kurzkettigen, unpolaren Substanzen auf dem eingesetzten Tenax TA; dies war bereits als Nachteil im Rahmen der Methodenoptimierung (Kapitel 3.1) beobachtet worden. Zum anderen wiesen die Chromatogramme eine schlechte Qualität auf. Dies äußerte sich z. B. in unzureichender Peakform – hohe Peakhalbwertsbreite, Doppelsignale – und auftretenden Koelutionen. Für die restlichen Substanzen waren sehr hohe Streubereiche festzustellen, so dass keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten (Anhang Abbildung 6, Seite A-19).

Zusammenfassung

Ein zweiter Typ Probenahmekörper in Form von Probenahmeröhrchen gefüllt mit modifizierten Polypropylenvliesen konnte so konzipiert werden, dass eine einheitliche Konfektionierung, eine gleichzeitige Adaption eines Mundstücks und eines Spirometers sowie ein Zugang für eine direkte SPME gewährleistet waren. Ein zunächst ungeeignetes Septenmaterial konnte identifiziert und durch PTFE/

Silikon-Septen ersetzt werden. Im Lagerversuch mit standarddotierten Proben zeigte sich eine starke Veränderung des VOC-Profiles während einer mehrwöchigen Lagerzeit. Ein Überspülversuch zur Untersuchung des Adsorptionsvermögens der Vliese lieferte nur wenige auswertbare Informationen.

Nachdem nun erste Untersuchungen an Modellen durchgeführt worden waren und zwei verschiedene Typen von Probenahmekörper zur Verfügung standen, hätte mit der Untersuchung realer Atemluftproben begonnen werden können. Wie sich bereits aus der Literatursauswertung ableiten ließ (vgl. Kapitel 2), wirken sich jedoch neben dem Gesundheitszustand noch viele weitere Faktoren auf das VOC-Profil in der Atemluft aus. Deswegen wurde zunächst getestet, ob nicht auch durch Einsatz eines Zellkulturmodells potentielle Biomarker abgeleitet werden konnten. Diese Versuche werden im nächsten Kapitel beschrieben.

3.3 Untersuchung der VOC-Profile von drei *in-vitro*-Lungenadenokarzinomzelllinien

Bevor die wertvollen Atemluftproben untersucht werden sollten, war zu testen, ob nicht auch Zellkulturen als ein Lungenkrebsmodell für die Identifizierung potentieller Biomarker eingesetzt werden können. Dies hätte den Vorteil einer im Vergleich zu den Atemproben von Lungenkrebspatienten erhöhten Probenverfügbarkeit. Zusätzlich wäre der Einfluss individueller Lebensumstände auf das VOC-Profil ausgeschlossen.

Der Kontakt zur Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH (EPO GmbH) stellte sich hierfür als glücklicher Umstand heraus. Die EPO GmbH ist im Bereich personalisierter Medizin aktiv; dort werden resezierte Lungentumore von Patienten in *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen auf das Ansprechverhalten gegenüber Chemotherapeutika untersucht. Mit der EPO GmbH stand also ein Partner mit Expertise in der Kultivierung von Lungenkrebszellen zur Verfügung. Als Modell für die ersten Untersuchungen zum Einfluss von Lungenkrebs auf das VOC-Profil wurden *in-vitro*-Lungenadenokarzinomzelllinien ausgewählt. Dabei standen sowohl eine kommerziell verfügbare Zelllinie zur Verfügung als auch zwei von der EPO GmbH etablierte [172]. Charakteristika dieser Zelllinien sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 11: Beschreibung der verwendeten humanen Lungenadenokarzinomzelllinien

	A549	Lu7466	Lu7387
Spender	58 Jahre, männlich	57 Jahre, männlich	53 Jahre, männlich
Nährmedium	Ham's F12 mit 10 % fetalem Kälberserum	Dulbecco's modified eagle medium / Ham's F-12 mit 20 % fetalem Kälberserum	
Mikroskopische Aufnahmen			

Die Zellkultivierung wurde durch die EPO GmbH durchgeführt. Die Anzucht erfolgte in Einwegkulturflaschen. Die Verwendung verschiedener Zellkulturmedien für die verschiedenen Zelllinien war durch die spezifischen Anforderungen der Zellen an ihr Wachstumsmilieu notwendig. Um die Orientierung innerhalb dieses Kapitels zu erleichtern, ist in Tabelle 12 eine Übersicht über alle in diesem Kapitel durchgeführten Versuche inklusive einiger Details angegeben.

Zu Beginn der Untersuchungen mit Zellkulturen war die Festlegung des Analytspektrums notwendig. Dies erfolgte auf Basis eines Vorversuches.

Tabelle 12: Versuchsübersicht für Kapitel 3.3

Kapitel	Versuchs- bezeichnung	Probe	Ziel-VOC (auswert- bare VOC)	Extraktionszeiten der angewendeten Probenahmeverfahren			
				<i>in-situ</i> - SPME	Teilprobe Gas	Teilprobe Kulturflüssigkeit	Probenahme- röhrchen
3.3.1	Vorversuch	A549	-	2 h 20 min	-	-	-
3.3.2	Optimierung SPME	A549	-	15, 30, 60 min	-	-	-
	ZKF-Leerwert	leere ZKF	-	(60 min) 15 min	-	-	-
	Reinigung ZKF	leere ZKF	- (53)	60 min	-	-	-
	Kalibrier- versuch 1	Standard-ZKF	73 (72)	60 min 15 min	-	-	-
	Faservergleich	Standard-ZKF	67 (62)	15 min	-	-	-
	Fasertransport	Standard-ZKF	67 (66)	15 min	-	-	-
	Kalibrier- versuch 2	Standard-ZKF	67 (67)	15 min	-	-	-
	quantitativer VOC-Vergleich	A549, Lu7387, Lu7466, Nährmedien	67 (57)	15 min	-	-	-
3.3.3	qualitativer VOC-Vergleich	A549, Lu7387, Lu7466, Nährmedien	67 (56)	15 min	60 min	15 min	60 min

ZKF: Zellkulturflasche, Standard-ZKF: gereinigte Zellkulturflasche mit Wasser und dotiertem Standardgemisch

3.3.1 Voruntersuchungen zum Einsatz der SPME-Technik

Die Durchführung eines Vorversuches war unabdingbar, um Erfahrung mit dem praktischen Umgang mit Zellkulturen zu erlangen und gegebenenfalls vorhandenen Optimierungsbedarf bei Anwendung der SPME-Technik aufzudecken. Ferner konnte dadurch das Analytspektrum für die weiteren Arbeiten ausgewählt werden.

Der Vorversuch wurde mit standardisierten, kommerziell zu erwerbenden A549-Zellen durchgeführt. Eine Herausforderung war dabei die räumliche Trennung der Zellkultivierung bei der EPO GmbH von der instrumentellen Analytik in den Laboratorien der BAM. Deswegen erfolgte die Probenahme durch direkte Exposition der SPME-Faser im Gasraum der Zellkulturflasche vor Ort bei der EPO GmbH als *in-situ*-Methode. Anschließend wurde die beladene Faser zur BAM transportiert und die GC-MS-Analyse durchgeführt.

Die direkte Einbringung einer SPME-Faser in eine Zellkulturflasche wurde bereits von Pyo *et al.* [95] angewendet, um den Einfluss eines zytotoxischen Medikaments auf das VOC-Profil der Lungenkrebszelllinie A549 zu untersuchen. Dabei geht aus der Methodenbeschreibung in der Veröffentlichung nicht hervor, ob die Extraktion in einem geschlossenen System oder in einem offenen System durchgeführt wurde. Standardmäßig sind die Zellkulturflaschen mit Sterilfilter-Deckeln ausgestattet, um einen Luftaustausch zwischen den Zellen und dem Brutschrank zu ermöglichen. Auf diese Weise kann durch den Zellstoffwechsel verbrauchter Sauerstoff nachgeführt und gebildetes Kohlenstoffdioxid abgeführt werden. Allerdings ermöglichen diese Verschlüsse eine SPME nur unter dynamischen Bedingungen. Nachteilig ist dabei der ständige Gasaustausch der Zellkultur mit der Umgebung; dadurch können sowohl Analytverluste als auch Kontaminationen auftreten. Um dieses Risiko auszuschließen, war zunächst die Durchführung der SPME unter statischen Bedingungen zu realisieren. Für den Vorversuch wurde provisorisch eine Polyethylen (PE)-Folie in den Deckel eingedreht (Abbildung 26), um den Luftaustausch zu unterbinden.



Abbildung 26: Durchführung der *in-situ*-SPME in A549-Zellkulturen während des Vorversuches; zum Luftabschluss wurde eine Kunststoffolie in den Deckel der Kulturflasche eingedreht

Die SPME wurde mit einer Car/PDMS-Faser (75 μm) im Brutschrank bei 37 °C für 2 h 20 min durchgeführt. Nach beendeter Extraktion mussten die beladenen SPME-Fasern für die weitere Analyse zur BAM transportiert werden. Dieser Transport sollte unter minimalem Kontaminationsrisiko und Analytverlust erfolgen. Dafür wurden Glasröhrchen (Kulturröhrchen) mit Schraubverschluss eingesetzt (Abbildung 30, Seite 43). In dieses Glasgefäß wurde die aus dem Halter entnommene SPME-Faser eingebracht und transportiert. Anschließend konnten die beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems thermodesorbiert und die dabei freigesetzten VOC getrennt und detektiert werden.

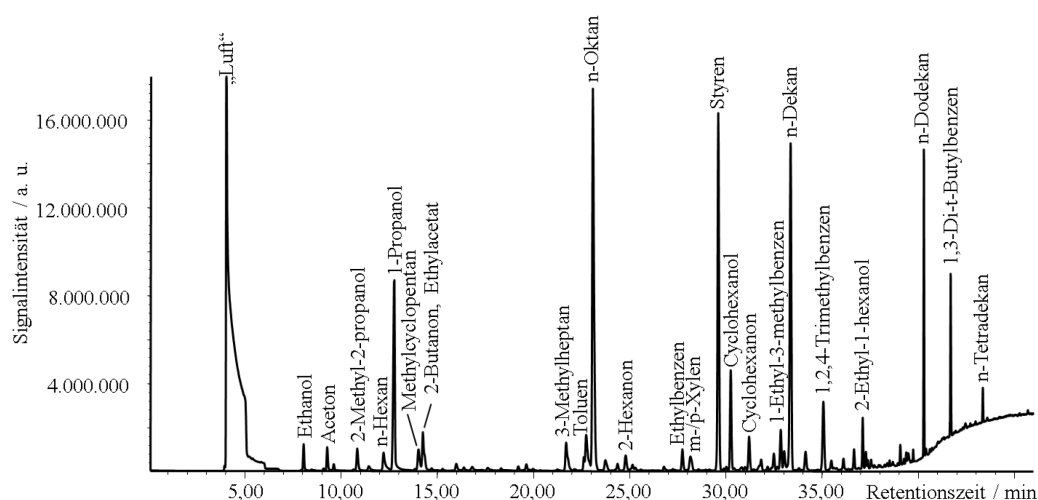


Abbildung 27: *In-situ*-SPME-GC-MS-Chromatogramm im HS einer A549-Zellkultur (Vorversuch)

In Abbildung 27 ist das Chromatogramm mit Identifizierung der intensitätsstärksten Signale dargestellt. Die angewendete Methode war für den Nachweis einer großen Anzahl von VOC ausreichend empfindlich. Insgesamt konnten 58 Signale mit einer Intensität von mindestens 100.000 a. u. erfasst werden, von denen die Identifikation für 55 erfolgte (Anhang Tabelle 22, Seite A-21). Die identifizierten Substanzen waren vor allem Alkane mit gerader Kohlenstoffanzahl, Alkohole, Ketone, Ester und Aromaten. Mit deutlich geringerer Intensität konnten auch Heteroaromaten, Aldehyde und halogenhaltige Verbindungen nachgewiesen werden. Eine ausführliche Liste ist in Anhang Tabelle 22 (Seite A-21) angegeben.

Aufbauend auf diesen Vorversuchen erfolgte unter Berücksichtigung der bereits durchgeführten Literaturstudie eine Auswahl der zu untersuchenden Verbindungen (s. Kapitel 4.1.2). Ferner verdeutlichten die erhaltenen hohen Signalintensitäten, dass auch geringere Extraktionszeiten ausreichen sollten. Darüber hinaus gaben mehrere Aspekte des Vorversuches Anlass zur Optimierung.

Erstens wurden die statischen Bedingungen für die SPME-Extraktion im Vorversuch durch Einlegen einer PE-Folie in den Filterdeckel erreicht. PE kann jedoch selbst noch VOC enthalten, wie z. B. restliches Monomer und Additive [173], und ist darüber hinaus durchlässig für Wasser und flüchtige Substanzen wie Aromastoffe [174, 175]. Deswegen hat die Firma TPP GmbH auf Nachfrage

einen speziellen Septumdeckel (Abbildung 28) eigens für die weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturversuche hergestellt, der ein gasdichtes Verschließen sowie ein Einführen der SPME-Faser oder einer Kanüle für die Luftentnahme erlaubte.



Abbildung 28: Septumkappe, entwickelt von TPP GmbH

Zweitens fertigte die BAM-Werkstatt ein Werkstück, welches den SPME-Halter während der Extraktion abstützte (Abbildung 29). Damit reduzierte sich das Risiko einer Beschädigung der Faser und es wurde ein genaues Positionieren der Faser in der Zellkulturflasche ermöglicht.

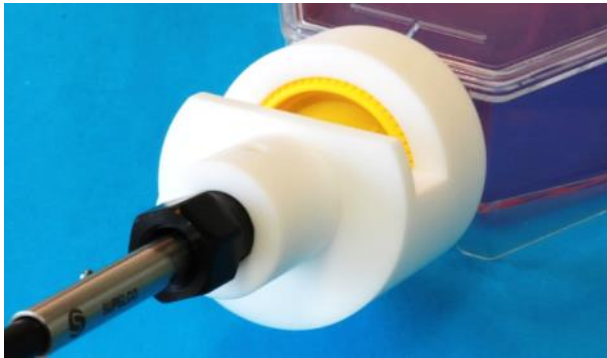


Abbildung 29: Stabilisierung der SPME-Faser in der Zellkulturflasche durch ein Teflonwerkstück

Drittens wurden zum Transport der beladenen Fasern Glasröhrchen verwendet. Das ursprünglich enthaltene Dichtungsmaterial in den Schraubdeckeln musste durch Silikon/PTFE-Septen (Abbildung 30) ersetzt werden, um eine nachteilige Beeinflussung der Analysen zu verhindern (Details sind im Anhang A.4 ab Seite A-21 dargelegt).

Nachdem nun die Vorversuche abgeschlossen waren, konnte die quantitative Analyse des VOC-Profiles von *in-vitro*-Lungenadenokarzinomzelllinien mit *in-situ*-SPME-GC-MS begonnen werden. Im Vergleich mit dem VOC-Profil von zellfreiem Nährmedium sollte die Ableitung von potentiellen lungenkrebspezifischen Biomarkern ermöglicht werden.

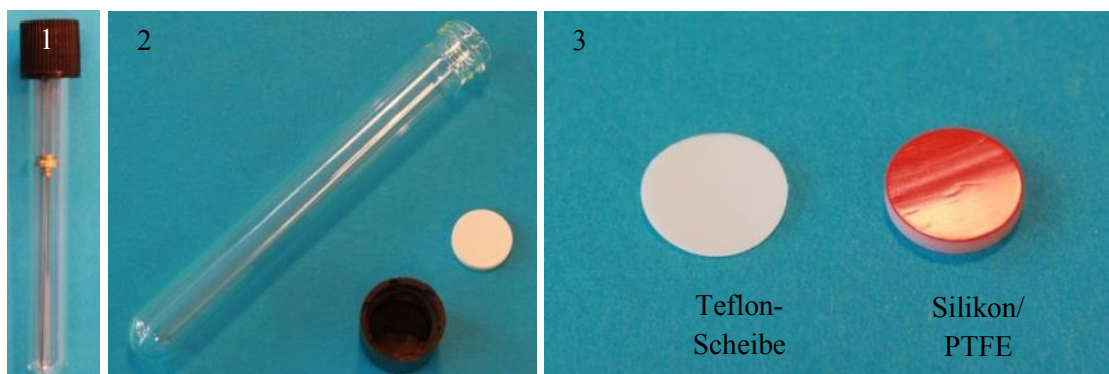


Abbildung 30: Material für den Transport beladener SPME-Fasern; 1: SPME-Faser in Glasröhrchen, 2: Glasröhrchen mit Schraubkappe und Originaldichtung, 3: alternative Dichtungen

3.3.2 Quantitative Analyse des VOC-Profiles mit *in-situ*-SPME-GC-MS

Um potentielle Biomarker für die Atemluftanalyse zur Lungenkrebsdiagnose zu identifizieren, wurde die quantitative Untersuchung des VOC-Profiles von Lungenkrebszellkulturen im Vergleich mit zellfreien Nährmedien als Strategie ausgewählt. Dies sollte wiederum mit einer SPME-Methode durchgeführt werden, da die Anwendbarkeit dieser Technik im Rahmen des Vorversuches bestätigt worden war. Für die *in-situ*-SPME direkt in der Zellkultur musste zunächst die Extraktionszeit optimiert werden.

Optimierung der SPME-Bedingungen für die Zellkulturanalytik mit in-situ-SPME

Durch eine im Vergleich zum Vorversuch (Kapitel 3.3.1) niedrigere SPME-Extraktionszeit kann die Zeitspanne, in welcher der Gasaustausch zwischen Zellkulturflasche und Brutschrankinnerem unterbrochen ist, reduziert werden. Damit wäre das Risiko der Stresserzeugung durch Sauerstoffmangel geringer, welches sich mutmaßlich auf das VOC-Profil auswirkt. Ein zusätzlicher Vorteil wäre der Zeitgewinn.

Aus diesem Grund wurde die *in-situ*-SPME in Zellkulturflaschen mit A549-Zellen für 15, 30 und 60 min durchgeführt, um eine optimale Extraktionszeit zu ermitteln. In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass bereits bei einer Extraktionszeit von nur 15 min Signale detektiert werden konnten. Abweichungen in den Retentionszeiten der Signale im Vergleich zum Vorversuch sind darin begründet, dass mittlerweile die GC-Parameter der zweiten Optimierung (vgl. Kapitel 3.1) angewendet wurden.

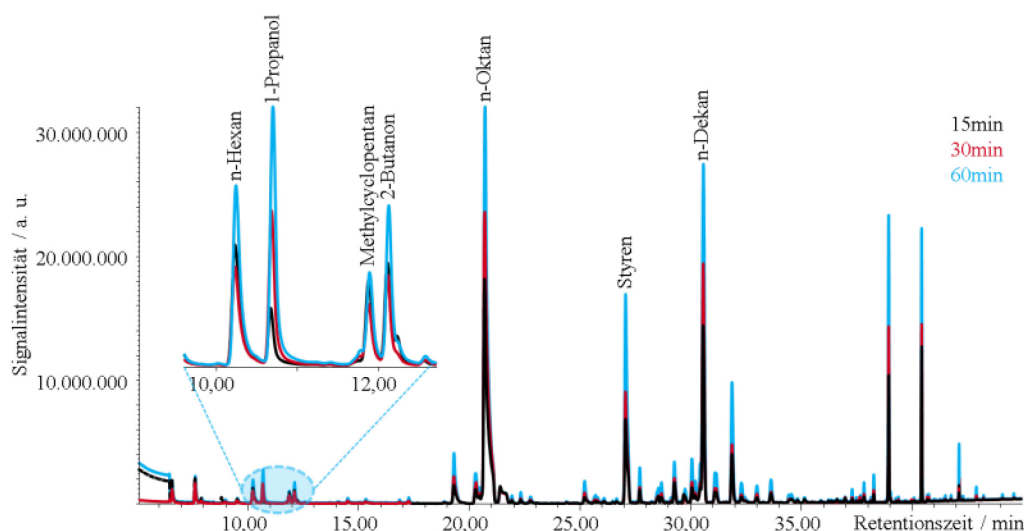


Abbildung 31: *In-situ*-SPME-GC-MS-Chromatogramme von A549-Zellkulturen mit verschiedenen Extraktionszeiten (15, 30, 60 min)

Generell war mit zunehmender Extraktionszeit eine Erhöhung der Signalintensitäten feststellbar. Aus diesem Grund wurde zunächst 60 min als Extraktionszeit für die *in-situ*-SPME festgelegt. Wie weiter unten dargestellt ist, wurde die Extraktionszeit im Verlauf der weiteren Untersuchungen auf 15 min reduziert. Eine Optimierung der Extraktionstemperatur war nicht möglich, da aufgrund der Bedingungen für das Zellwachstum die Temperatur des Brutschranks, indem die Extraktion erfolgte, auf 37 °C festgelegt war.

VOC-Hintergrundbelastung von Zellkulturflaschen

Da für die Kalibrierung leere Zellkulturflaschen eingesetzt werden sollten, diese jedoch aus Kunststoff bestanden, wurde der Leerwert neuer Zellkulturflaschen mit *in-situ*-SPME-GC-MS bestimmt. Dieser Versuch wurde zunächst mit einer Extraktionszeit von 60 min durchgeführt und später mit einer Extraktionszeit von 15 min wiederholt. Da sich diese beiden Versuche im Ergebnis nicht wesentlich unterschieden, wird in der detaillierten Beschreibung der Durchführung (Anhang A.4) als auch in der

Auswertung nur auf den zweiten Versuch eingegangen. Eine Diskussion des Chromatogramms (Abbildung 44, Seite 64) findet im Ergebnisteil statt. An dieser Stelle sei nur vermerkt, dass die VOC-Hintergrundbelastung der leeren Zellkulturflasche nicht vernachlässigbar war und deswegen vor Durchführung eines ersten Kalibrierversuches gesenkt werden musste.

Test verschiedener Reinigungsprozeduren für Zellkulturflaschen

Es wurden zwei Reinigungsverfahren zur Reduktion der Grundbelastung der Zellkulturflaschen getestet. Beim „Spülen“ wurden neue Zellkulturflaschen je dreimal mit Wasser und Methanol gespült und anschließend mit einem Strom von Druckluft getrocknet. Bei der „Adsorption“ wurde in neue Zellkulturflaschen Aktivkohlegranulat eingebracht und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die *in-situ*-SPME-GC-MS-Profile der gereinigten Zellkulturflaschen ermittelt und mit denen von unbehandelten Zellkulturflaschen verglichen. Die SPME erfolgte dabei mit 60 min Extraktionszeit.

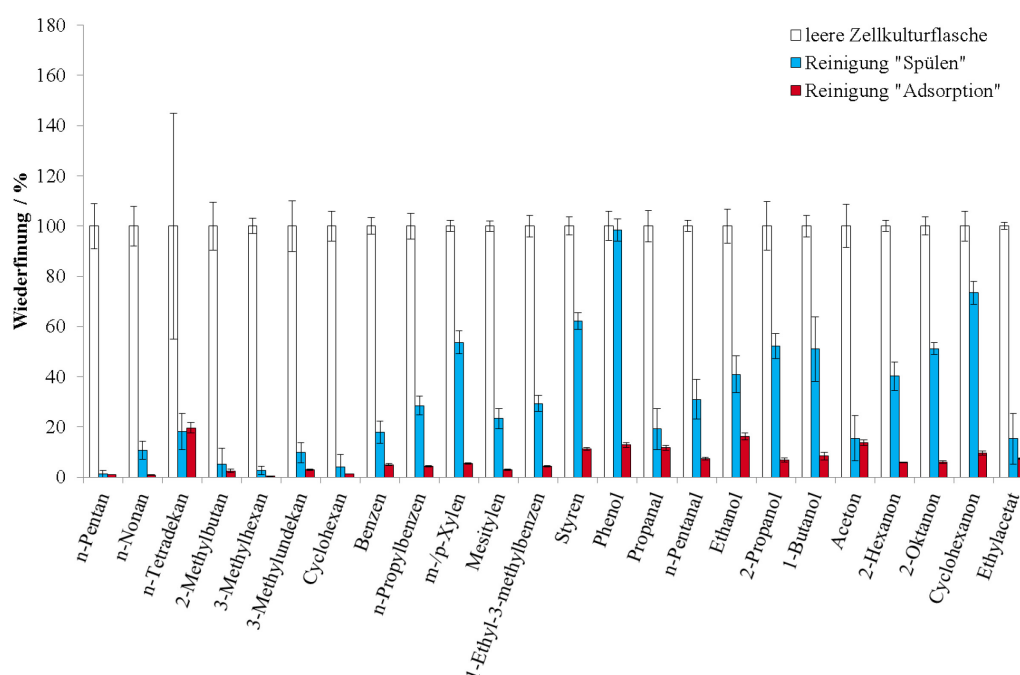


Abbildung 32: Einfluss der Reinigungsprozedur auf die Wiederfindung ausgewählter VOC in leeren Zellkulturflaschen, untersucht mit *in-situ*-SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, n=3); weiß: unbehandelt, blau: Reinigung durch Spülen mit Methanol und Wasser, rot: Reinigung durch Adsorption an Aktivkohle

In Abbildung 32 sind die Wiederfindungen ausgewählter VOC in den gereinigten Flaschen im Vergleich zu unbehandelten Flaschen dargestellt. Die Ergebnisse für alle 53 ausgewerteten VOC können in Anhang Tabelle 24 (Seite A-25) eingesehen werden.

Durch Spülen mit Methanol, Wasser und Druckluft erfolgte bereits eine deutliche Reduktion der Hintergrundbelastung der 53 betrachteten VOC. Die besseren Ergebnisse konnte durch Inkubation mit Aktivkohle erzielt werden. Auf diese Weise erfolgte eine Absenkung der Hintergrundkontamination auf 20 % oder weniger. Folglich wurde nachfolgend die Methode „Adsorption“ für die Reinigung der Zellkulturflaschen als Vorbereitung angewendet.

Festlegung des Analysenspektrums

Ein Teil der im Vorversuch detektieren Verbindungen sollte bei den weiteren Versuchen als Zielsubstanzen näher betrachtet werden. Hinzu kamen ausgewählte VOC (2-Methyl-1-penten, 2,4-Dimethyl-1-hepten, 2-Methyl-2-propenal, 3-Methylbutanal, 2-Methyl-2-butenal), die in der Literatur [99] als durch Lungenkrebszellen gebildet oder metabolisiert beschrieben waren (vgl. Tabelle 1, Seite

8) und als potentielle Biomarker interessant erschienen. Insgesamt wurden zunächst 73 Substanzen untersucht (Anhang Tabelle 25, Seite A-27).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen fand eine Reduktion auf 67 Substanzen (Anhang Tabelle 26, Seite A-29) statt, weil die Signale einiger Zielsubstanzen aufgrund von Koelution in Kombination mit dem Fehlen spezifischer Fragmente nicht auswertbar waren oder kein Nachweis dieser Substanzen in den weiteren Untersuchungen an Proben stattfand.

An dieser Stelle soll auf einen Aspekt der MS-Detektion eingegangen werden: Die Aufzeichnung der Daten erfolgte ausschließlich im Scan-Modus. Eine parallele Erfassung von SIM-Daten für die Zielsubstanzen wurde nicht eingeführt, da die hohe Anzahl an Verbindungen das Festlegen von Retentionszeitfenstern erschwerte. Sehr viele Fragmente hätten sich innerhalb eines Detektionsfensters befunden, wodurch der Empfindlichkeitsgewinn durch die SIM-Aufzeichnung teilweise nivelliert worden wäre. Darüber hinaus wiesen die niedermolekularen VOC nur wenige, unspezifische Fragmente auf. Die Zugrundlegung des gesamten Massenspektrums führte bei der Zuordnung zu einer höheren Sicherheit.

Festlegung eines Modellsystems als Basis für die Kalibrierung

Für die quantitative Untersuchung musste ein Modellsystem für die Kalibrierung festgelegt werden. Da die SPME eine sehr stark matrixbeeinflusste Technik ist, wurde entschieden, die Kalibrierung direkt in Zellkulturflaschen durchzuführen. Um das Nährmedium zu simulieren, wurden 25,0 mL Wasser eingebracht. In dieses konnten für die Kalibrierung die flüssigen Standardlösungen dotiert werden. Als Verschluss wurde, wie bei den Zellkulturen, der Septumdeckel eingesetzt. Die Temperierung der vorbereiteten Zellkulturflaschen erfolgte im Trockenschrank bei 37 °C.

Erster Kalibrierversuch in Zellkulturen mit in-situ-SPME-GC-MS (Extraktionszeit 60 min)

Da nun das Analysenspektrum auf zunächst 73 Zielsubstanzen festgelegt und die SPME-Bedingungen für die *in-situ*-Untersuchungen ermittelt worden waren, konnte mit der Kalibrierung des Verfahrens begonnen werden. Dafür wurden die 73 Zielsubstanzen in ein methanolisches Standardgemisch eingebracht und insgesamt sechs Standardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (Anhang Tabelle 25, Seite A-27).

Für die Probenvorbereitung wurden gereinigte Zellkulturflaschen mit Wasser versetzt, mit Septumdeckeln verschlossen und methanolische Standardlösungen mittels gasdichter Spritze durch das Septum in die Zellkulturflasche dotiert. Nach Inkubation im Trockenschrank für 1 h wurde die *in-situ*-SPME bei 37 °C mit einer Extraktionszeit von 60 min durchgeführt, gefolgt von der GC-MS-Analyse. Ergebnisse für ausgewählte Substanzen in Form der graphischen Auftragung der Signalflächen gegen die VOC-Konzentration im Standard sind in Abbildung 33 dargestellt. Die Ergebnisse für weitere Zielsubstanzen sind im Anhang (Anhang Abbildung 10, Seite A-28) dargelegt.

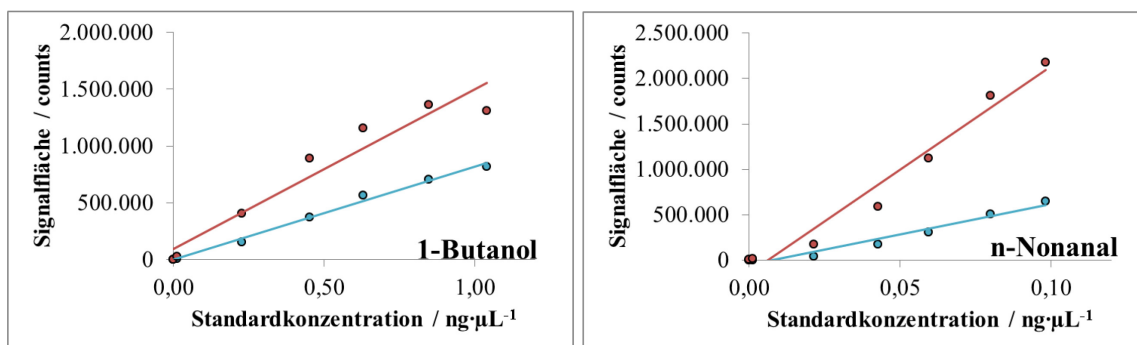


Abbildung 33: Kalibriergeraden von 1-Butanol und n-Nonanal für den ersten Kalibrierversuch der *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik in mit Standard dotierten Zellkulturflaschen mit einer Extraktionszeit von 60 min (rot) und 15 min (blau)

Es ist deutlich zu erkennen, dass für viele Substanzen keine linearen Ausgleichsgeraden mit zufriedenstellendem Regressionsmaß angepasst werden konnten; für die meisten VOC waren konkave

oder konvexe Verläufe zu beobachten. Für viele niedermolekulare Substanzen, wie z. B. 1-Butanol, konnte bei höheren Konzentrationen die Bildung eines Plateaus beobachtet werden. Dies könnte durch eine Verdrängung dieser Substanzen von der Faser durch andere Substanzen begründet sein. Andererseits konnten für die Stoffe mit höherer Kohlenstoffanzahl, wie z. B. n-Nonanal, konvexe Kurven beobachtet werden. Eine mögliche Hypothese dafür ist die Ausbildung eines Lösungsmittelfilms auf der Faser, welcher eine zunehmend verbesserte Löslichkeit dieser Stoffe bedingen könnte.

Es lag die Vermutung nahe, dass bei den untersuchten Konzentrationen eine Überladung der SPME-Faser stattgefunden hatte. Aus diesem Grund wurde die Kalibrierung unter Anwendung einer reduzierten Extraktionszeit von 15 min wiederholt. Dadurch konnte für viele Substanzen eine ausreichend gute lineare Regression erhalten werden (Abbildung 33 und Anhang Abbildung 10, Seite A-28). Allerdings war auch ein Empfindlichkeitsverlust mit zunehmendem Molekulargewicht der Verbindungen festzustellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Untersuchungen mit einer Extraktionszeit von 15 min durchgeführt, um eine Überladung der SPME-Faser zu vermeiden.

Untersuchung der Vergleichbarkeit bei der parallelen Verwendung mehrerer SPME-Fasern

Aus Gründen der Effizienz war geplant, bei einem Besuch bei der EPO GmbH parallel drei Ansätze mit Zellen und drei Ansätze mit zellfreiem Nährmedium zu untersuchen. Folglich wurden sechs SPME-Fasern nebeneinander eingesetzt. Deswegen war im Weiteren zu klären, ob vor dem Hintergrund der Messunsicherheit sich die mit verschiedenen Fasern derselben Belegung (Car/PDMS 75 µm) und derselben Charge analysierten VOC-Profile signifikant unterschieden. Dafür wurden Zellkulturflaschen mit Wasser und Standardlösung versetzt und mit *in-situ*-SPME extrahiert. Dieses Vorgehen wurde nacheinander für sechs verschiedene SPME-Fasern durchgeführt. Die Ergebnisse für ausgewählte VOC sind in Abbildung 34 dargestellt. Eine Übersicht über alle Ergebnisse findet sich in Anhang Tabelle 27 (ab Seite A-31).

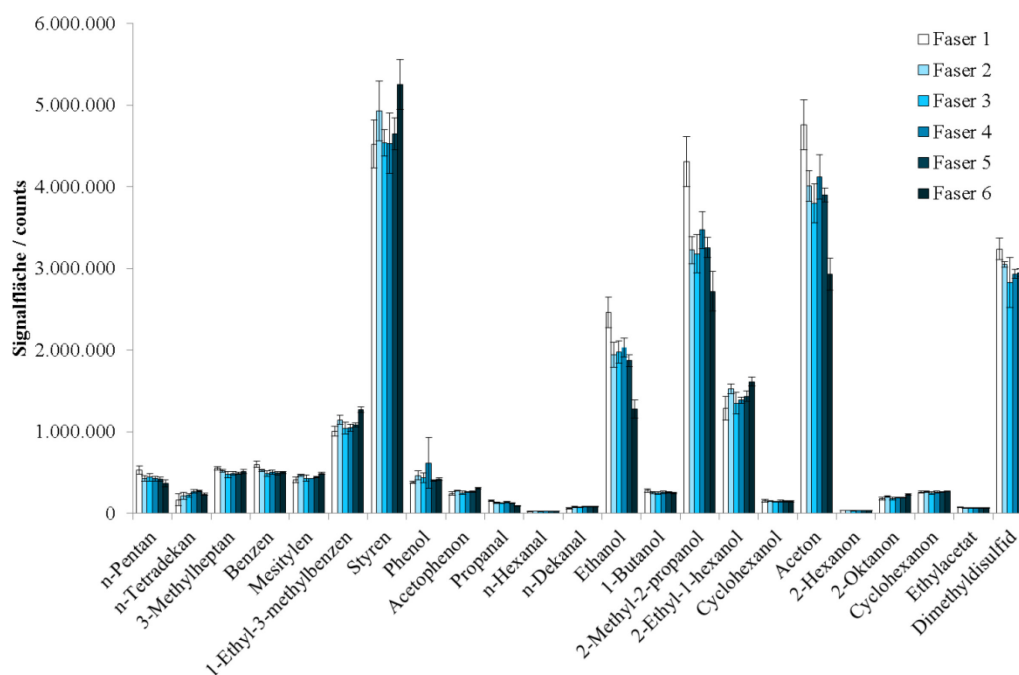


Abbildung 34: Vergleichbarkeit von sechs Car/PDMS-Fasern (75 µm) einer Charge bei der Bestimmung ausgewählter VOC mit *in-situ*-SPME-GC-MS in mit Standard dotierten Zellkulturflaschen (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Im Allgemeinen konnten mit fünf der sechs Fasern vergleichbare Signalflächen für die verschiedenen Analyten ermittelt werden. Dabei wurden relative Standardabweichungen von weniger als 20 %

beobachtet. Ausnahme ist dabei die Faser Nr. 4, welche für Phenol einen unzureichenden Wert von 50 % aufwies. Für Faser Nr. 1 konnten erhöhte mittlere Signalintensitäten für die kurzkettigen Alkane C₅-C₇ beobachtet werden sowie eine ungenügende relative Standardabweichung zwischen 27 und 43 % für die langkettigen n-Alkane mit C₁₂-C₁₄.

Ausgehend von diesen Untersuchungen ist deutlich zu erkennen, dass verschiedene Fasern derselben Charge nicht in jedem Fall gleiche Ergebnisse liefern, sondern dies für jede Faser und jede Substanz extra überprüft werden muss. Faser Nr. 1 wurde für die Kalibrierung und die anschließend durchgeführte quantitative VOC-Bestimmung in Zellkulturen ausgetauscht. Ferner wurde für jede der bei der quantitativen VOC-Bestimmung eingesetzten SPME-Faser eine separate Kalibrierung vorgenommen.

Einfluss des SPME-Fasertransportes auf das analysierte VOC-Profil

Die Zellanzucht und *in-situ*-SPME in den Zellkulturen erfolgte bei der EPO GmbH in Berlin-Buch, während die weitere GC-MS-Analytik an der BAM in Berlin-Adlershof durchgeführt wurde. Während des Transports wurden die beladenen SPME-Fasern zur Minimierung von Analytverlust und Kontamination in verschraubbaren Gläsern, gekühlt auf Trockeneis, transportiert.

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob dieses Verfahren für die VOC-Untersuchungen in Zellkulturen geeignet war. Dafür wurden Zellkulturflaschen mit Wasser und Standardlösung versetzt und mit *in-situ*-SPME extrahiert. Anschließend folgte entweder direkt die GC-MS-Analyse oder die Lagerung für 3, 6 oder 9 h in Glasröhrchen auf Trockeneis bis zur Analyse.

Ergebnisse für ausgewählte VOC sind in Abbildung 35 dargestellt. Eine Übersicht für alle untersuchten VOC findet sich in Anhang Tabelle 28 (Seite A-33). Während der gesamten Lagerzeit von bis zu 9 h wurden mit Ausnahme für Phenol und Pyrrol akzeptable Wiederfindungsraten im Bereich von 77-126 % festgestellt. Für Phenol hingegen konnten Wiederfindungen von 300 % (nach 6 h) bzw. 200 % (nach 9 h) beobachtet werden und für Pyrrol (vgl. Anhang Tabelle 28) wurde bei der Faserlagerung für 3-9 h ein Überbefund von jeweils 200% ermittelt. Ferner ergab sich für Phenol eine hohe Streuung und somit eine schlechte Wiederholbarkeit. Ebenso wurden für die Alkane mit mindestens zehn Kohlenstoffatomen als auch für die Aldehyde mit mindestens acht Kohlenstoffatomen unbefriedigende Wiederholbarkeiten ermittelt.

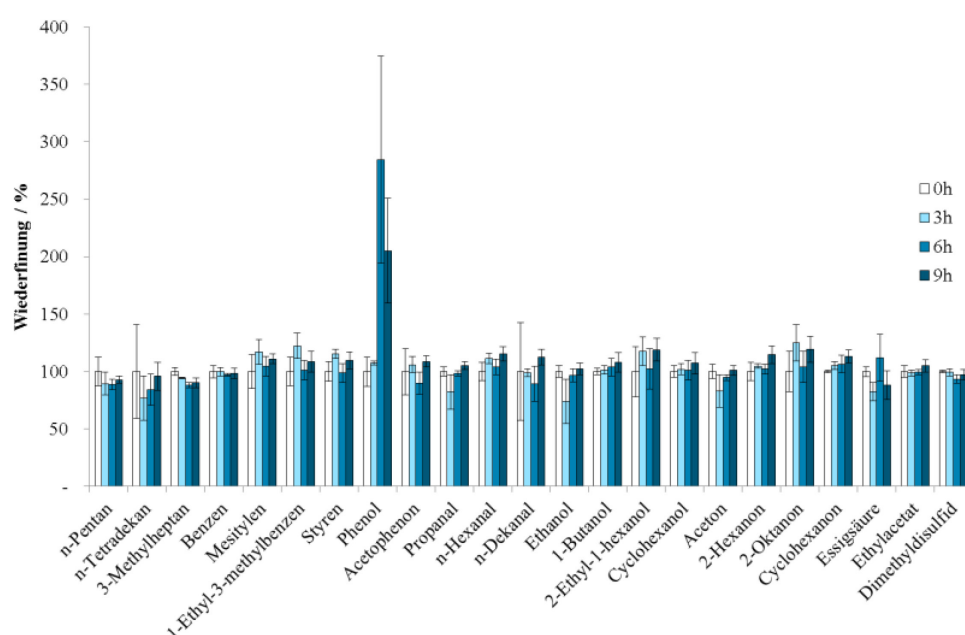


Abbildung 35: Wiederfindungen ausgewählter VOC bei der Lagerung von beladenen SPME-Fasern in verschraubbaren Gläsern auf Trockeneis für verschieden Zeiten von 0 bis 9 h gefolgt von GC-MS-Analyse (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Eine Erklärung für die Überbefunde bei der Lagerung kann nicht gegeben werden. Die ungünstigen Streuungen hingegen stehen im Einklang mit den unzureichenden Wiederholbarkeiten, die schon bei dem Versuch zum Faservergleich auftraten. An dieser Stelle deutete sich bereits an, dass die entwickelte *in-situ*-SPME-GC-MS-Methode mit der Car/PDMS-Faser nicht gleichermaßen für alle ausgewählten VOC geeignet war.

Zweiter Kalibrierversuch in Zellkulturen mit in-situ-SPME-GC-MS (Extraktionszeit 15 min)

Nachdem nun verschiedene Probleme adressiert worden waren, konnte ein zweiter Versuch zur Kalibrierung der *in-situ*-SPME-GC-MS-Methode zur quantitativen VOC-Bestimmung in Zellkulturen erfolgen. Dabei wurden im Vergleich zum ersten Kalibrierversuch folgende Punkte abgewandelt:

Die für den ersten Kalibrierversuch mit einer Extraktionszeit von 60 min vorgenommene Mischung von 73 Standardsubstanzen in einem Standardgemisch war umständlich und fehleranfällig. Aus diesem Grund wurden für den zweiten Ansatz mit der optimierten Extraktionszeit von 15 min die nun 67 Standardsubstanzen auf insgesamt 4 Kalibriersätze aufgeteilt (Anhang Tabelle 26, Seite A-29). Davon wurden drei Sets mit dem Lösungsmittel Methanol hergestellt und ein Set mit Wasser. Diese Aufteilung trug den sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen der einzelnen Substanzen Rechnung. Darüber hinaus erleichterte es eine erschütterungsarme Herstellung der Stammlösung M1, welche die leichtflüchtigen Alkane enthielt. Essigsäure wurde in Wasser gelöst, da es beim Ansetzen in Methanol zur Esterbildung kam. Es erfolgte wiederum die Herstellung von sechs Kalibrierniveaus. Der umfasste Kalibrierbereich ist in Anhang Tabelle 30 (Seite A-36) dargelegt. Ferner wurde die Extraktion mit einer Extraktionszeit von 15 min anstelle 60 min durchgeführt. Die Kalibrierung wurde für sechs Car/PDMS-Fasern jeweils separat als Einfachbestimmung durchgeführt.

Die Anpassung einer Kalibrierfunktion erfolgte für jede Faser und für jede der Zielsubstanzen separat. Im Allgemeinen wurde eine lineare Kalibrierfunktion erhalten, wobei auch für wenige Substanzen ein quadratischer Zusammenhang bestand (Anhang Tabelle 29, Seite A-35). Ein Bestimmtheitsmaß unter 0,96 für eine Substanz für mindestens eine Faser wurde als unzureichend eingestuft und es erfolgte keine Quantifizierung dieses Stoffes in den Zellkulturen. Die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen wurden aus dem Chromatogramm für die Standardlösung mit der niedrigsten Konzentration für eine Faser abgeleitet, indem auf ein Signalverhältnis 1:3 oder 1:10 extrapoliert wurde (Anhang Tabelle 29, Seite A-35). Die Auswertung der Kalibrierung ist im Ergebnisteil in Kapitel 4.1.2 dargestellt.

Quantitative Untersuchung des VOC-Profiles in in-vitro-Lungenadenokarzinomzelllinien

Die quantitative Untersuchung wurde an den drei Zelllinien A549, Lu7387 und Lu7466 sowie an den zellfreien Nährmedien (vgl. Tabelle 11, Seite 40) vorgenommen. Dabei wurden für jede Zelllinie parallel drei Ansätze extrahiert sowie drei Ansätze mit dem korrespondierenden Nährmedium. Da das Nährmedium für die Zelllinien Lu7387 und Lu7466 dasselbe war, liegen dafür insgesamt sechs Datensätze vor. Die *in-situ*-SPME wurde mit Car/PDMS-Fasern (75 μm) für 15 min im Brutschrank bei 37 °C durchgeführt. Dabei wurde protokolliert, welcher Ansatz mit welcher Faser durchgeführt wurde, um die zugehörige faserspezifische Kalibrierfunktion in der Auswertung anzuwenden. Für jeden Ansatz wurde für ein spezifisches Fragment jeder Zielsubstanz die Signalfächen aus den Chromatogrammen ermittelt. Die VOC-Gehalte in der Einheit $\mu\text{g-Zellkulturflasche}^{-1}$ in den Zellen oder den Nährmedien wurden berechnet, indem die faser- und substanzspezifischen Regressionsfunktionen auf die ermittelten Signalfächen in der Probe angewendet wurden. Die ermittelten VOC-Gehalte aus den Zellansätzen wurden mit dem zugehörigen zellfreien Kulturmedium durch einfaktorielle ANOVA unter Anwendung eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$ verglichen. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.1.2 dargelegt.

Nachdem die Quantifizierung von VOC in Lungenkrebszellkulturen erfolgreich durchgeführt worden war, erfolgte die Anwendung anderer Probenahmeverfahren, wie im folgenden Teil beschrieben wird.

3.3.3 Vergleichende Untersuchung zum Einfluss weiterer Probenahmeverfahren

Parallel zu der bisher beschriebenen *in-situ*-SPME wurde die Möglichkeit ergriffen, noch andere Probenahmeverfahren an den Zellkulturen durchzuführen und qualitativ miteinander zu vergleichen. Dafür gab es drei Gründe:

1. Zunächst ergab der Vergleich des Zellmodells mit der Untersuchung von Atemluft, dass die *in-situ*-SPME mit Beprobung der kompletten Kulturflasche inklusive Nährmedium und Zellen nur bedingt der Atemluftanalytik ähnelte. Eine bessere Vergleichbarkeit des Zellkulturmodells mit der Atemluft sollte gegeben sein, wenn nur die separierte Gasphase aus den Zellkulturansätzen untersucht würde.
2. Des Weiteren kam die Frage auf, ob mit verschiedenen Probenahmeverfahren vergleichbare VOC-Profile erhalten werden. Bisher kam die *in-situ*-SPME zum Einsatz. Diese war in ähnlicher Form bereits von Pyo *et al.* [95] eingesetzt worden (siehe Kapitel 3.3.1). Chen *et al.* [93] hatten die HS-SPME auf separierte Kulturflüssigkeit von kultivierten Lungenkrebszellen aus reseziertem Gewebe angewendet, um Biomarker für Lungenkrebs zu identifizieren. Der Atemluftanalyse am ähnlichsten scheint demgegenüber die Untersuchung der separierten Gasphase zu sein. In einem qualitativen Ansatz wurde für die drei Zelllinien der Einfluss dieser drei Probenahmeverfahren auf das VOC-Profil untersucht.
3. Nicht zuletzt könnte die separierte Gasphase auch in Probenahmeröhrchen mit Adsorbervlies appliziert werden. Damit würden weitere Untersuchungen zum Einfluss des Adsorbervlies auf das VOC-Profil einer gasförmigen Probe ermöglicht.

Die *in-situ*-Probenahme ist bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben. Die Probenahme mit den anderen drei Probenahmeverfahren erfolgte parallel zu den *in-situ*-Proben, die unter Anwendung einer Extraktionszeit von 15 min untersucht wurden. Dafür wurden für jede Lungenadenokarzinomzelllinie bzw. für das korrespondierende Nährmedium drei weitere Kulturflaschen vorbereitet. Aus den gleichen Zellkulturflaschen wurde die separierte Gasphase (Bezeichnung als Teilprobe Gas) beprobt, die Teilprobe Kulturflüssigkeit entnommen und die Applikation von Zellkulturluft in Probenahmeröhrchen durchgeführt. Nachfolgend sind die drei Probenahmeverfahren kurz umrissen.

Das Vorgehen bei der Probenahme der **Teilprobe Gas** ist in Abbildung 36 veranschaulicht. Ein mit synthetischer Luft gefülltes, verschlossenes Vial wurde partiell evakuiert, indem daraus 15 mL Luft in eine gasdichte Spritze aufgezogen wurde. Sofort im Anschluss erfolgte die Entnahme von 15 mL Gasphase aus der Zellkulturflasche mittels einer gasdichten Spritze. Diese Gasteilprobe wurde in das partiell evakuierte Vial eingebracht. Anschließend wurde das gefüllte Vial zur BAM transportiert und mit HS-SPME-GC-MS untersucht. Es wurde wiederum die Car/PDMS-Faser (75 µm) für die Extraktion eingesetzt. Die Extraktion fand bei 37 °C für 60 min statt. Die Extraktionszeit wurde für die Teilprobe Gas gegenüber der *in-situ*-SPME auf 60 min erhöht, um die Verdünnung der Teilprobe mit der Restluft im Vial auszugleichen.

Ferner wurde für die Teilprobe Gas an zusätzlichen Proben der A549-Zellkultur untersucht, ob der Zusatz einer Lösung mit internem Standard möglich ist und ob sich darüber eine bessere Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse realisieren lässt. Versuchsdurchführung und Ergebnisse sind im Anhang A.4 beschrieben. Hier soll nur kurz erwähnt werden, dass der Zusatz der methanolischen, internen Standardlösung zu der gasförmigen Probe zu einem signifikanten Intensitätsverlust geführt hat. Diese Intensitätserniedrigung könnte durch das Lösungsmittel Methanol verursacht worden sein, welches als zusätzliche flüssige Phase die Gleichgewichtseinstellung mit der Faser beeinflusst. Somit erwies sich dieses Vorgehen nicht als praxistauglich.



Abbildung 36: Probenahme der Teilprobe Gas aus Zellkulturen für die HS-SPME-GC-MS-Analyse; 1: Probenahmehmaterial bestehend aus gasdichter Glasspritze, Kanüle, partiell evakuiertem Vial und Zellkulturflasche mit Septumkappe, 2: Entnahme von 15 mL Luft aus der Zellkulturflasche, 3: Befüllen des partiell evakuierten Vials mit 15 mL Luft aus dem Luftraum der Zellkulturflasche

Bei der Probenahme der **Teilprobe Kulturflüssigkeit** wurde Nährmedium aus den Zellkulturflaschen mit Lungenadenokarzinomzellen bzw. mit zellfreiem Nährmedium entnommen und steril filtriert. Von dem Filtrat wurden 5 mL Kulturflüssigkeit in ein Vial abgenommen. Die Untersuchung dieser Proben erfolgte automatisiert mit HS-SPME-GC-MS. Für die Extraktion kam eine Car/PDMS-Faser (75 μ m) bei 37 °C für 15 min zum Einsatz.

Die Applikation von Zellkulturluft in **Probenahmeröhrchen** wurde mittels gasdichter Spritze durchgeführt, mit der eine Einbringung von insgesamt 300 mL Luft aus den Zellkulturen in das Vlies der geöffneten Probenahmeröhrchen erfolgte. Das Vorgehen ist in Abbildung 37 veranschaulicht. Die Analyse der befüllten Probenahmeröhrchen erfolgte mit HS-SPME-GC-MS. Dafür wurden die Probenahmeröhrchen im Trockenschrank auf 37 °C temperiert und für 60 min mit einer Car/PDMS-Faser (75 μ m) extrahiert; die Extraktionszeit wurde analog zur Untersuchung der Teilprobe Gas gewählt.

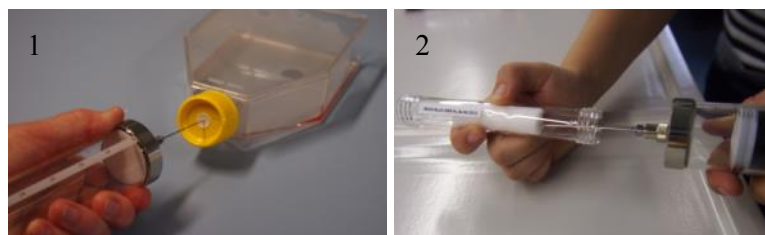


Abbildung 37: Applikation von Zellkulturluft in Probenahmeröhrchen

1: Entnahme von Luft aus der Zellkulturflasche, 2: Zugabe von entnommener Luft in das Probenahmeröhrchen

Für die Probenahme mit *in-situ*-SPME wurde auf die Ergebnisse aus der quantitativen Betrachtung zurückgegriffen. Für die anderen Probenahmeverfahren wurden die Signalflächen aus den Chromatogrammen der Zellansätze mit denen aus den zugehörigen zellfreien Kulturmedium durch einfaktorielle ANOVA unter Anwendung des Signifikanzniveaus $\alpha=0,05$ verglichen. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.1.3 dargestellt und werden dort ausführlich diskutiert.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich aus den durchgeführten Untersuchungen an *in-vitro*-Lungenkrebszelllinien ableiten, dass die Untersuchung dieses Modells nur sehr eingeschränkt zur Biomarkersuche in Atemluft für die Lungenkrebsdetektion eingesetzt werden konnte (vgl. Kapitel 4.3). Folglich wurde mit der Untersuchung von Realproben begonnen, um gegebenenfalls auf diesem Wege potentielle Biomarker identifizieren zu können.

3.4 Untersuchung der VOC-Profile von Realproben

Nachdem die soeben beschriebenen Untersuchungen des VOC-Profils von Zellkulturen nicht zur Identifizierung geeigneter Biomarkerkandidaten führten (Kapitel 3.3 und 4.1), wurden die weiteren Bemühungen auf Realproben und dabei vor allem auf reale Atemluftproben von Lungenkrebspatienten ausgerichtet. Wie bereits in Kapitel 2.3.3 ausgeführt, basiert die statistische Ableitung von Biomarkern auf dem Vergleich von Analysendaten für Erkrankte und Gesunde. Die Möglichkeit Atemluftproben von Lungenkrebspatienten und gesunden Menschen zu erhalten, war durch die BIOAIR-Studie gegeben. Für diese Studie lag ein positives Votum der Ethikkommission der Charité (EA1/207/13)

vor. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte durch Studienärzte. Bevor jedoch Atemluftproben von den Studienteilnehmern genommen werden konnten, musste eine Strategie für die Probenahme entwickelt werden, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

3.4.1 Entwicklung einer Strategie zur qualitätsgesicherten Probenahme von Realproben

Aufbauend auf der Modellentwicklung (vgl. Kapitel 3.2) stand bereits fest, dass die Atemluftprobenahme sowohl mit Gassammelrohren aus Glas mit einem Volumen von 1 L als auch mit adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen durchgeführt werden sollte. Ferner war eindeutig vereinbart, dass die Beprobung der Patienten in den Kliniken durch die Ärzte und Studienschwestern stattfinden musste, während die instrumentelle Analyse des VOC-Profiles der Atemluftproben in der BAM erfolgte. Demgegenüber wurden Atemluftproben gesunder Probanden auch an der BAM genommen. Darüber hinaus waren jedoch noch weitere Aspekte und Parameter bei der Probenahme von Atemluft in Zusammenarbeit mit den Ärzten festzulegen bzw. zu ermitteln.

Ein Großteil des Probenahmeprotokolls wurde administrativ festgelegt. Ein zentraler Punkt war die Anzahl und Art der Atemluftproben. Die Studienärzte hatten bisher mit drei Probenahmen je Patient gute Erfahrungen gemacht. Diese drei Proben wurden auf ein Gassammelrohr und zwei Probenahmeröhrchen aufgeteilt. In dem Gassammelrohr ließ sich das unbeeinflusste VOC-Profil der Atemprobe bestimmen; dieses sollte quantitativ untersucht werden, um potentielle Biomarker zur Lungenkrebsdiagnose zu identifizieren. Ein Probenahmeröhrchen mit Vollkappen war für das Hundetraining (vgl. Kapitel 3.2.2), während das zweite für die qualitative VOC-Analyse bestimmt war.

Das Atemmanöver für die Probenahme wurde in enger Absprache mit den Studienärzten festgelegt. Dabei sollte der Studienteilnehmer im Sitzen maximal einatmen und anschließend langsam durch den Probenahmekörper maximal ausatmen. Dieses Manöver wird nach Aussage der Studienärzte im Bereich der Atemfunktionsprüfung zur Ermittlung der expiratorischen Vitalkapazitätsgrenze eingesetzt. Demnach bestand die Probe aus gemischt expiratorischer Atemluft (vgl. Kapitel 2.3.1).

Die zentrale Frage nach der Anzahl der Atemzüge je Probe wurde experimentell geklärt. Wie in Kapitel 2.3.1 dargelegt, können bei der Atemluftprobenahme Proben bestehend aus einem Atemzug oder aus mehreren Atemzügen genommen werden. Der Vorteil der Verwendung mehrerer Atemzüge könnte darin bestehen, dass gegebenenfalls eine repräsentativere Probe erhalten wird, als bei der Probenahme mit einem Atemzug, der zufällig einen besonders niedrigen oder besonders hohen Gehalt an VOC enthalten könnte. Andererseits ist bei Pulmologen die Ansicht verbreitet, dass beim tiefen, forcierten Ausatmen im ersten Atemzug die Stoffkonzentration am höchsten ist und bei kurz darauf folgenden Atemzügen verarmt. Entsprechend würde die Anwendung mehrere Atemzüge zu einer Verdünnung der Atemluftprobe führen. Aus diesem Grund wurde experimentell die ideale Anzahl an Atemzüge je Atemluftprobe ermittelt. Dafür wurden Probenahmeröhrchen kurz hintereinander beatmet und analysiert. Für die Auswertung wurde das Isoprensignal als Leitsubstanz ausgewählt, da dessen endogene Herkunft belegt ist [72] und es im Rahmen der Untersuchung der VOC-Hintergrundbelastung der Vliese (vgl. Kapitel 3.2.2) nicht beobachtet worden war.

In Abbildung 38 ist deutlich zu erkennen, dass für das zuerst beatmete Röhrchen die höchsten Signalintensitäten für Isopren beobachtet werden konnten. Folglich ist ein Atemzug für die Probenahme als günstigster Parameter auszuwählen.

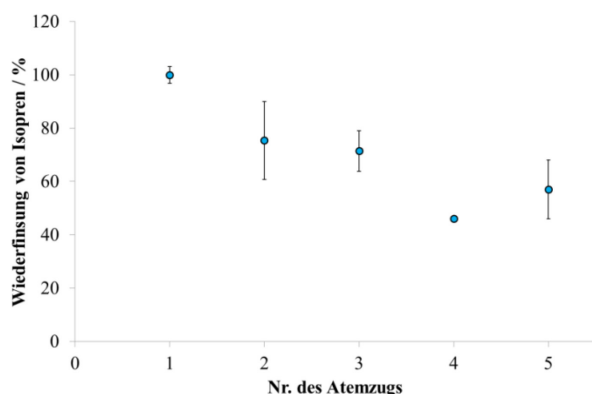


Abbildung 38: Wiederfindung von Isopren in fünf aufeinander mit einem Atemzug beatmeten Probenahmeröhrchen analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, $n=2$); die Signalfäche des ersten Atemzugs wurde auf 100 % gesetzt, mit zunehmender Probennummer ist eine Reduktion der Signalintensität zu beobachten

Von jedem Studienteilnehmer sollten, wie oben festgestellt, drei Atemluftproben genommen werden. Andererseits führte die Probenahme zu einer Verarmung von VOC in der Atemluft. Folglich musste eine Wartezeit ermittelt werden, die zwischen der Probenahme von zwei Atemluftproben einzuhalten war, damit der Studienteilnehmer sich erholen konnte und der VOC-Gehalt in der Lunge wieder das Anfangsniveau erreichte. Dafür wurden mehrere Probenahmeröhrchen mit unterschiedlichen Wartezeiten von 5, 10 oder 15 min beatmet und wiederum das Verhalten des Isoprensignals untersucht (Abbildung 39). Die geringste relative Standardabweichung von 13 % wurde für eine Wartezeit von 10 min erreicht. Demnach war es wünschenswert, bei zwei aufeinanderfolgenden Probenahmen eine Wartezeit von mindestens 10 min einzuhalten.

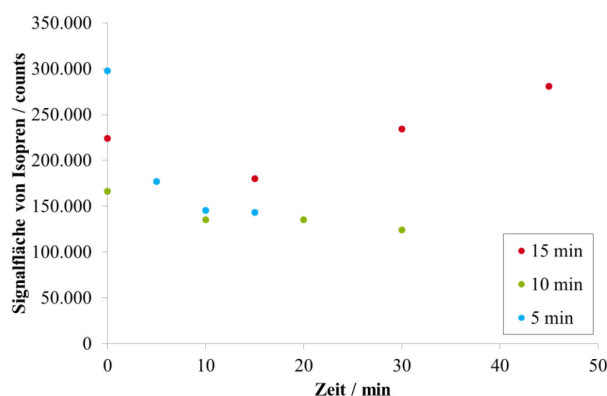


Abbildung 39: Veränderung des Isoprensignals in Abhängigkeit der Wartezeit (5-10 min) zwischen aufeinanderfolgenden Atemluftprobenanalysen analysiert mit HS-SPME-GC-MS im Probenahmeröhrchen; unterschiedliche Signalintensitäten zum Zeitpunkt $t=0$ resultieren aus der Durchführung an verschiedenen Tagen

Im Selbstversuch wurde die Wiederholbarkeit einer fünfmaligen Probenahme von Atemluft mit dem Gassammelrohr unter Einhaltung der ermittelten Wartezeit von 10 min untersucht. Dabei konnte für Isopren eine gute Wiederholbarkeit von 10 % (ausgedrückt als relative Standardabweichung) ermittelt werden. Damit wurden durch Anwendung des Gassammelrohres für die Atemluftprobenahme die Ergebnisse bestätigt, die aus der Untersuchung beatmeter Probenahmeröhrchen abgeleitet worden waren. Ferner wurde diese Analyse für weitere 17 VOC ausgewertet (Anhang Tabelle 33, Seite A-43). Für 13 dieser Substanzen konnten relative Standardabweichungen von 3 % für Aceton bis 17 % für 1-Butanol ermittelt werden, was als ausreichend gut betrachtet wird; für die anderen vier VOC ergaben sich unzureichend hohe relative Standardabweichungen von 32 % bis 61 %.

Nachdem nun ermittelt worden war, dass jede Probe mit einem Atemzug zu nehmen war und zwischen zwei Proben eine Wartezeit von mindestens 10 min realisiert werden sollte, konnte die Wartezeit zwischen der ersten Atemluftprobenahme und des letzten Konsums von Lebensmitteln und Tabakwaren auf mindestens 30 min festgelegt werden. Eine darüber hinaus gehende Zeit wurde von den Ärzten als nicht praktikabel eingeschätzt.

Darüber hinaus war zu ermitteln, welches minimale Atemluftvolumen für eine vollständige Befüllung des Gassammelrohres mit nur einem Atemzug notwendig war. Dafür erfolgte ein Versuch zum Gasaustausch. 1 μ L Ethanol wurde in einem 1 L-Gassammelrohr vorgelegt, für ein vollständiges

Verdunsten des Lösungsmittels für 1 h bei Raumtemperatur equilibriert und der Glaskörper mit einem definierten Ausatemvolumen (Spirometerkontrolle) beatmet. Anschließend wurde der Restgehalt an Ethanol in dem beatmeten Probenahmekörper durch HS-GC-MS analysiert. Bei einem Ausatemvolumen von 1,5 L konnte wiederholt ein Gasaustausch von 95 % erreicht werden, so dass diese Menge als Minimalvolumen für die Probenahme festgelegt wurde.

Um zu kontrollieren, ob auch die Lungenkrebspatienten mit eingeschränkter Lungenfunktion das Gassammelrohr vollständig füllen konnten, sollte die Probenahme mit den Probenahmeröhrchen mit Hilfe eines Spirometers monitoriert werden; auf die direkte Kontrolle bei dem Gassammelrohr wurde aufgrund der erhöhten Bruchgefahr dieses Probenahmekörpers und dem damit verbundenem Verletzungsrisiko verzichtet. Aufgrund des damit einhergehenden Aufwandes erfolgte diese Kontrolle nicht bei den Gesunden; bei Ihnen wurde ein Atemvolumen von mindestens 1,5 L angenommen.

Da bereits aus der Literaturrecherche (Kapitel 2.3.1) hervorgegangen war, dass die Umgebungsluft einen starken Einfluss auf das VOC-Profil des Atems haben kann, wurde die Blindwertprobenahme in der ELK und in der BAM eingeführt. Jeden Probenahmetag wurde eine Probe von der Umgebungsluft mit einem sauberen Gassammelrohr genommen. In der ELK wurde dafür eine manuelle Pumpe mit einem Volumen von 1 L eingesetzt, während in der BAM eine an den Probenahmekörper angeschlossene Membranpumpe für 30 s die Raumluft einsog. Das Vorgehen der Blindwertprobenahme in der ELK ist in der StAA BAM-1.2-ALA-04 (Seite A-83) beschrieben.

Die Patientensicherheit war bei der Probenahme der Atemluftproben wesentlich. Ein direkter Mundkontakt zu den Glaskörpern war aufgrund des Einsatzes von Mundstücken ausgeschlossen. Für die Verbindung von Mundstück und Gassammelrohr, Mundstück und Probenahmeröhrchen sowie Probenahmeröhrchen und Spirometer waren Adapter notwendig, die aus Polyethylen durch die BAM-Werkstatt angefertigt wurden. Die für die Beatmung vorbereiteten Probenahmekörper sind in Abbildung 40 dargestellt.

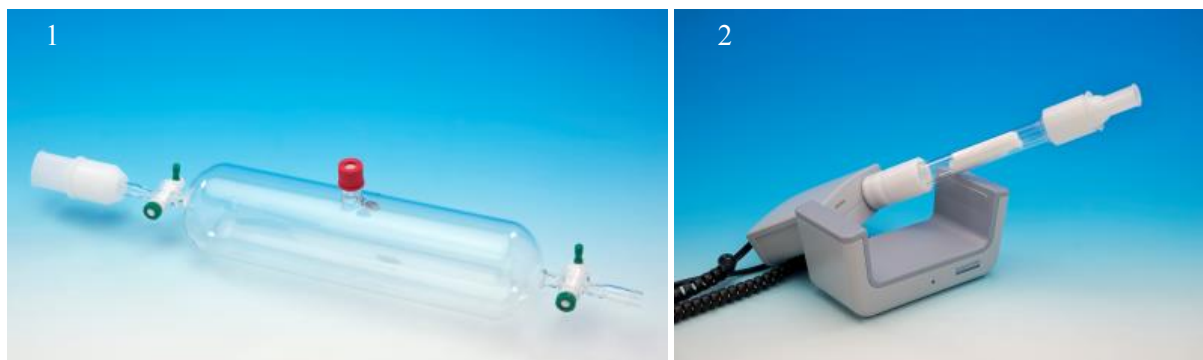


Abbildung 40: Vorbereitetes Equipment für die Probenahme von Atemluft von Studienteilnehmern; 1: Gassammelrohr mit Mundstück, 2: adsorbervliesgefülltes Probenahmeröhrchen mit Mundstück und Spirometer

Für den leichten und sicheren Transport des Equipments wurden Aluminiumkoffer mit Schaumstofffüllung ausgewählt. Damit war ein bruchfreier Transport des Equipments möglich, was sowohl den Schutz der Studienbeteiligten als auch die Unversehrtheit der kostbaren Proben gewährleisten sollte. Um zu verhindern, dass nach der Probenahme das benutzte Mundstück mit dem Schaumstoff in Berührung kam, wurden verschließbare Aufbewahrungsbehälter ausgewählt, in welche die benutzten Mundstücke platziert werden konnten. Ein vorbereiteter Koffer für die Atemprobenahme ist in Abbildung 41 abgebildet.

Um die Datensicherheit der Patienten zu gewährleisten, wurden auf den Patientenfragebogen und den Probenahmekörpern Etiketten mit Codenummern verwendet. Den an der Probenahme beteiligten Studienärzten und Studienschwestern war die einer bestimmten Codenummer zugehörige Identität des Studienteilnehmers bekannt, um bei nachfolgenden Visiten eine Zuordnung der Daten und Proben

sicherzustellen. Den anderen an der Studie Beteiligten war diese Information nicht zugänglich. Folglich lag hier eine Pseudonymisierung der Daten vor.



Abbildung 41: Probenahmekoffer für die BIOAIR-Studie mit zwei adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen, einem Gassammelrohr, Mundstück und Adaptern

Die Codierung für die Etiketten bestand aus vier Ziffern für den Studienteilnehmer sowie einer Ziffer zur Kennzeichnung der einzelnen Probe. Dabei stand 1xxx für die Charité, 5xxx für die ELK und 7xxx für die BAM. Der Code x0xx war für Patienten, x5xx für Gesunde und x9xx für Blindwertproben reserviert. Die letzten beiden Ziffern der Viererfolge waren fortlaufend. Das erste Probenahmeröhrchen für das Hundetraining hatte die Nummer xxxx-1, das zweite Probenahmeröhrchen bekam die Nummer xxxx-2 und das Gassammelrohr die Nummer xxxx-3; die Probenahme erfolgte in dieser Reihenfolge. Die Etiketten für die Probenahmeröhrchen wurden einseitig angebracht, so dass auf diese Weise auch gleich die vorgeschriebene Beatmungsseite gekennzeichnet war. Die Atemluftproben Nr. 1-3 wurden von den Patienten genommen, nachdem sie in die Kliniken gekommen waren und bevor andere diagnostische Mittel zur Anwendung kamen. Darüber hinaus gab es noch die Probennummern xxxx-4 und die xxxx-5, für gesundes Gewebe bzw. Tumorgewebe (vgl. Kapitel 3.4.5) sowie die Nummer xxxx-6 für Verlaufskontrollproben. Bei dem letzten Probenotyp wurde eine Atemluftprobe drei Monate nach der Tumoresektion mit einem Gassammelrohr genommen. Die Probenahmekörper für diese Proben waren nicht in dem Koffer enthalten, sondern wurden extra vorbereitet und transportiert. In der vorliegenden Arbeit werden aus Datenschutzgründen keine Daten mit einzelnen Codes in Verbindung gesetzt.

Die Probenahmekörper in den Koffern wurden mit je einem Etikett beklebt. Ferner wurden weitere Etiketten mit Patientencode beigelegt, die von den Studienschwestern vor Ort für klinikeigene Dokumente verwendet werden konnte. Zusätzlich zu den Etiketten gab es in den Koffern grüne Klebepunkte zur Markierung der Probenahmekörper und Koffer nach erfolgter Atemluftprobenahme.

Ferner mussten personenbezogene Daten, wie z. B. Diagnose und Anamnese, in einem Erhebungsbogen zusammengetragen werden. Die zu erhebenden Daten wurden in Absprache mit den Studienärzten ausgewählt. Die Information mit der höchsten Priorität bezüglich der Patienten war die Bestätigung der Lungenkrebserkrankung; dies war vor allem bei den Proben aus der ELK vorrangig, da diese Patienten zum Zeitpunkt der Probenahme erst kürzlich vom Hausarzt überstellt worden waren und somit zunächst nur ein Verdacht auf Lungenkrebs vorlag. Von allen Studienteilnehmern wurde das Alter, das Geschlecht und das Rauchverhalten erfasst sowie der Zeitpunkt der Probenahme, der Zeitpunkt des letzten Konsums von Lebensmitteln und Tabakwaren und bei den Patienten das Atemvolumen bei der Probenahme mit Probenahmeröhrchen. Darüber hinaus wurden Daten über die Krankheitsgeschichte und Begleiterkrankungen dokumentiert. Mit diesen konnte nachvollzogen werden, ob weitere maligne Erkrankungen vorlagen. Beispiele für Erhebungsbögen sind in Anhang Abbildung 19 und Anhang Abbildung 20 (ab Seite A-85) dargestellt.

Vorbereitete Koffer wurden von der BAM in die Kliniken gebracht und lagerten dort, bis sie benötigt wurden. Der Transport gefüllter Probenahmekoffer von den Kliniken zur BAM fand

organisationsbedingt ein bis drei Tage nach der Probenahme statt. Die instrumentelle Analyse der Atemluftproben mit HS-SPME-GC-MS wurde am Anlieferungstag durchgeführt.

Die hier beschriebene Probenahmestrategie wurde als Standardarbeitsanweisung (BAM-1.2-ALA-01, Seite A-78) formuliert und freigegeben. Es erfolgte diesbezüglich eine Einweisung der Studienschwestern vor Ort in den Kliniken.

Nachdem nun die Prozedur bei der Probenahme feststand, konnten Screeninguntersuchungen an Atemluftproben von Patienten in Gassammelrohren durchgeführt werden, um das Spektrum der zu untersuchenden Substanzen auszuwählen.

3.4.2 Screeninguntersuchung von Atemluftproben zur Festlegung des Analytspektrums

Die geplante Biomarkeridentifizierung durch Einsatz statistischer Verfahren, wie der linearen Diskriminanzanalyse, setzte quantitative Analysendaten für die beiden Studiengruppen Patienten und Gesunde voraus. Voraussetzung für die Quantifizierung war eine substanz- und matrixspezifische Kalibrierung für die Atemluftproben in Gassammelrohren. Im Vorfeld musste dafür ein Analytspektrum ausgewählt werden.

Im Rahmen der Literaturrecherche waren bereits Substanzklassen aus dem Bereich der VOC ermittelt worden, die in der Diskussion als potentielle Biomarker in der Atemluft für eine Lungenkrebsdiagnose standen (vgl. Kapitel 2.2). In Kombination mit der Screeninguntersuchung der ersten Atemluftproben von Patienten aus den Kliniken sollte ein Analytspektrum für die weiteren Untersuchungen abgeleitet werden.

Es erfolgte die Analyse von Atemluftproben in Gassammelrohren von sechs Patienten mit HS-SPME-GC-MS unter Einsatz der während der Methodenentwicklung optimierten Parameter. Die SPME wurde mit einer Car/PDMS (75 µm)-Faser für 1 h bei Raumtemperatur (23 °C) durchgeführt. Die sich anschließende GC-MS-Analyse erfolgte mit den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen.

Ein Beispiel für ein HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm der Atemluftprobe eines Lungenkrebspatienten ist in Abbildung 27 (Seite 42) dargestellt. Darüber hinaus findet sich in Anhang Tabelle 34 (Seite A-45) eine tabellarische Auswertung der Chromatogramme für alle untersuchten Screeningproben. Eine ausführliche Auswertung zu den Screeninguntersuchungen findet sich in Kapitel 4.2.1. Es erfolgte die Auswahl von 24 Zielsubstanzen:

- Alkane: n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan, n-Oktan, n-Nonan, n-Dodekan, 2-Methylpentan, 3-Methylpentan, Cyclohexan, Methylcyclopentan
- Aromaten: Benzen, Ethylbenzen, n-Propylbenzen
- Aldehyde: n-Propanal, n-Butanal, n-Pentanal, n-Hexanal, n-Heptanal, n-Oktanal, n-Nonanal, n-Dekanal
- Alkohol: 1-Butanol
- Ketone: 2-Butanon, 2-Pentanon

Weil die Proben mit einer SPME-Methode analysiert wurden und diese Probenahmetechnik stark matrixbeeinflusst ist, wurden zusätzlich drei Substanzen in den Standard integriert, die mit hohen Signalintensitäten in den Screeningproben beobachtet wurden: Isopren, Aceton und 2-Propanol (vgl. auch Kapitel 3.2.1). Für die Zielsubstanzen wurde eine SIM-Methode (Anhang Tabelle 17, Seite A-12) erstellt, um die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen.

Für die Zielsubstanzen wurde getestet, ob durch Abwandlung des Analysenverfahrens anstelle einer Einfach-, eine Mehrfachbestimmung für jede Atemluftprobe durchführbar wäre. Dafür wurde untersucht, wie sich eine Aliquotierung der Luft im Gassammelrohr in HS-Vials auf die detektierten Signalintensitäten der Zielsubstanzen auswirkt. Für die Aliquotierung wurden verschlossene, mit synthetischer Luft gespülte 20 mL-Vials partiell evakuiert, indem mit einer gasdichten Glasspritze

15 mL Luft aus dem Inneren des Vials aufgezogen und verworfen wurden. Anschließend wurden sofort 15 mL Atemluft aus einem beatmeten Gassammelrohr in die Spritze aufgezogen und in das vorbereitete Vial gegeben und analysiert. Zum Vergleich wurden Atemluftproben direkt in den Gassammelrohren untersucht. Für 19 der 21 auswertbaren Zielsubstanzen betrug die mittlere Wiederfindung in den aliquotierten Proben bezogen auf die Untersuchung mit direkter SPME weniger als 20 %. Dieser Empfindlichkeitsverlust ist nachvollziehbar, da bei der Aliquotierung ein geringeres Atemluftvolumen für die Extraktion zur Verfügung stand, während bei Anwendung der direkten SPME 1 L Probe extrahiert wurde. Folglich ist die Aliquotierung nicht für die Untersuchung von Atemluft auf VOC im Spurenbereich geeignet, so dass die direkte SPME in dem Gassammelrohr zur Untersuchung der Atemluftproben beibehalten und auf eine Mehrfachbestimmung zwangsläufig verzichtet wurde.

Da das Analytspektrum und die Parameter der HS-SPME-GC-MS-Methode nun endgültig festgelegt waren, konnte mit der Ermittlung einiger Kenndaten der Methode für die Zielanalyten begonnen werden.

3.4.3 Quantitative Analyse von Atemluftproben in Gassammelrohren

Qualitätskontrolle und Quantifizierung des VOC-Gehalts in Atemluft

Nachdem das Analysenspektrum festgelegt war, konnten mit einem VOC-Standardgemisch Validierungsdaten für die HS-SPME-GC-MS-Methode zur VOC-Analytik in Atemluftproben in Gassammelrohren ermittelt werden. Die Versuchsdurchführung dazu ist bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben worden.

Die Methode wurde über neun Konzentrationsniveaus aufbauend auf dem Modell der feuchten synthetischen Luft (vgl. Kapitel 3.2.1) kalibriert. Die Kalibrierung fand jedes Mal statt, wenn eine neue SPME-Faser zum Einsatz kam sowie zur erneuten Überprüfung nach ca. 50 Analysenläufen (entspricht der halben Verwendungsdauer einer SPME-Faser). Ferner erfolgte eine neue Kalibrierung, sobald neue Standardlösungen hergestellt wurden. Die Standardlösungen waren nur bis zu drei Monate zu verwenden. Die SPME-Faser wurde nach ca. 100 Analysenläufen durch eine neue ersetzt. Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde einmalig mit der Kalibriergeradenmethode durchgeführt. Ferner wurde der Einfluss einer Probenlagerung über vier Tage untersucht. Die ausführliche Versuchsbeschreibung ist in Kapitel 3.2.1 angegeben, während sich die Auswertung und die Bewertung der Ergebnisse in Kapitel 4.2.2 finden.

Als Basis für die Quantifizierung wurden arbeitstäglich drei Qualitätskontrollstandards zusätzlich zu den Atemluftproben untersucht, um die während der Kalibrierung ermittelten Regressionsfunktionen an den aktuellen Faser- und Systemzustand (vgl. Kapitel 3.2.1) anzupassen. Mit den aktualisierten Kalibrierfunktionen wurden dann die Atemluft- und Blindwertproben quantitativ ausgewertet. Zusätzlich zu diesen Qualitätskontrollanalysen wurden arbeitstäglich eine GC-MS-Analyse ohne Probenaufgabe durchgeführt und ein SPME-Faserblindwert nach dem Ausheizen aufgenommen. Nach Beendigung der Analysen eines Arbeitstages wurde die Faser in ein verschließbares Glasröhrchen gegeben, um die VOC-Adsorption aus der Umgebungsluft zu reduzieren.

Im Weiteren erfolgte die Untersuchung einiger potentieller Einflussgrößen auf den VOC-Gehalt in der Atemluft mit Atemluftproben gesunder Freiwilliger.

Eigenuntersuchungen zum Einfluss der Umgebungsluft auf die Atemluftgehalte

Es wurden zwei Eigenuntersuchungen mit gesunden Probanden zum Einfluss des VOC-Hintergrundes auf die Gehalte im Atem durchgeführt.

In Durchführung A hielt sich der Proband für 2 h im Arztraum (Probenahmeraum für gesunde Probanden) in der BAM auf. Direkt nach dem Betreten, nach 30 min und nach 120 min Aufenthalt wurde je eine Atemprobe mittels Gassammelrohr und parallel eine Blindwertprobe genommen.

Bei Durchführung B hielt sich ein Proband zunächst für 1 h in einem nahegelegenen Park an der frischen Luft auf. Anschließend wurden eine Blindwertprobe und je eine Atemprobe an der frischen Luft mittels Gassammelrohr genommen. Daraufhin hielt sich der Proband für 30 min im Arztraum in der BAM auf und es erfolgte eine zweite, analoge Probenahme im Arztraum.

Die Atemluft- und Blindwertproben wurden zusammen mit Qualitätskontrollstandardproben mittels HS-SPME-GC-MS analysiert. Die Untersuchungen wurden für drei Probanden je zweimal an verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse befinden sich in Kapitel 4.2.4.

Eigenuntersuchung zum Einfluss des Rauchens für einen kurzen Zeitraum

Für die Probenahme bei Studienteilnehmern war festgelegt worden, dass eine minimale Wartezeit von 30 min zwischen dem letzten Konsum von Lebensmitteln oder Tabakwaren und der Probenahme der ersten Atemluftprobe eingehalten werden sollte. Im Selbstversuch wurde nun für das Rauchen überprüft, ob diese Karenzzeit ausreichend war, um akute Einflüsse durch den Tabakkonsum auf die Atemluftzusammensetzung auszuschließen. Dafür wurde entsprechend dem Probenahmeprotokoll eine Atemluftprobe mit dem Gassammelrohr 10 min vor dem Rauchen in einem Büro bei geöffnetem Fenster genommen, um das VOC-Grundlevel zu erfassen. Anschließend erfolgte das Rauchen eines Zigarillos auf Lunge. Kurz nach dem Rauchen ($t=0$) sowie 10, 30 und 120 min später wurde jeweils eine weitere Atemluftprobe mit dem Gassammelrohr genommen. Diese Proben wurden zusammen mit Qualitätskontrollstandardproben mittels HS-SPME-GC-MS analysiert. Der Versuch wurde dreimal an verschiedenen Tagen durchgeführt. Bei einer Durchführung schlug die Datenaufzeichnung für den Zeitpunkt $t+30$ min fehl. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.2.5 dargestellt.

Im Anschluss an diese Eigenuntersuchungen zur Bewertung potentieller Einflussfaktoren auf den VOC-Gehalt in der Atemluft konnten die Atemluftproben und Blindwertproben aus der Studie untersucht werden.

Atemluftproben Gesunder und Lungenkrebskranker im Rahmen der Studie

Die wesentlichen Einschlusskriterien für die Lungenkrebspatienten beinhalteten, dass ein Verdacht auf Lungenkrebs bestand bzw. bereits bestätigt war, die Atemfunktion ausreichend gut war, damit mindestens 1,5 L Atemluft gespendet werden konnte, und zum Zeitpunkt der Probenahme und der 5 Jahre zuvor keine weiteren malignen Erkrankungen bestanden. Für die Gesunden war Voraussetzung, dass sie während der letzten 5 Jahre keine Krebserkrankung hatten, nach eigener Aussage keine akute Atemwegserkrankung vorlag und ein Mindestalter von 50 Jahren bestand. Vor allem die Alterseinschränkung führte dazu, dass verhältnismäßig wenig gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen werden konnten.

Der Einschluss der Studienteilnehmer erfolgte im Zeitraum Juni 2014 bis Juli 2015. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte sowohl an der Charité als auch an der ELK. An der Charité wurde der Einschluss von Patienten vorgenommen, die kurz vor einer Operation standen. Demgegenüber erfolgte an der ELK der Einschluss für Patienten, die kürzlich vom Hausarzt überwiesen worden waren und somit noch am Beginn der konventionellen Diagnostik standen. Atemproben von Gesunden wurden sowohl an der Charité, der ELK als auch an der BAM genommen.

Die Probenahme von Atemluft setzte das Einverständnis der Patienten und der Gesunden nach erfolgter Aufklärung durch einen Studienarzt voraus. Die Probenahme von Atemluftproben erfolgte gemäß der freigegebenen Standardarbeitsanweisung BAM-1.2-ALA-01, die auf der in Kapitel 3.4.1 entwickelten Probenahmestrategie basierte. Durch die Gesunden wurden in den Kliniken zunächst nur Probenahmeröhrchen beatmet, während später auch Atemluftproben in Gassammelrohren hinzu-

kamen. Die Blindwertproben in der ELK wurden entsprechend der StAA BAM-1.2-ALA-04 und die in der BAM mit einer Membranpumpe genommen.

Die gefüllten Probenahmekoffer wurden innerhalb von ein bis drei Tagen zur BAM transportiert und die Proben anschließend analysiert. Zunächst wurden die Atemluftproben in den Gassammelrohren und anschließend die Probenahmeröhrchen (Kapitel 3.4.4) untersucht. Die durchgeführten Qualitätskontrolluntersuchungen sind in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Die Analyse erfolgte mit SPME für 1 h bei Raumtemperatur (23 °C) gefolgt von GC-MS mit den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (Kapitel 3.2.1), allerdings unter paralleler Detektion von Scan- und SIM-Daten. Für die Auswertung wurde für jede Zielsubstanz die Signalfläche für das Target-m/z im SIM-Modus bestimmt. Für die Identifizierung wurde das Verhältnis Qualifier-m/z zu Target-m/z und die Peakform betrachtet. Bei Unstimmigkeiten wurde im Scan-Modus ein Abgleich des detektierten Massenspektrums mit dem Spektrum einer authentischen Substanz vorgenommen.

Die Quantifizierung der Atemluftproben in den Gassammelrohren im Rahmen der Studie erfolgte auf Basis der zeitnah durchgeführten Qualitätskontrolluntersuchungen. Gehalte unter der Nachweisgrenze wurden als nicht detektierbar dokumentiert. Werte über der Nachweis- aber unter der Bestimmungsgrenze wurden mit dem ermittelten Zahlenwert in die Auswertung integriert; andernfalls hätte für die statistische Analyse ein zusätzlicher Stellvertreterwert für diese Daten eingeführt werden müssen, ohne dass dadurch die Aussagekraft der statistischen Auswertung verbessert worden wäre. Daten, bei denen die bestimmten Gehalte über dem Kalibrierbereich lagen, wurde der errechnete Zahlenwert zugewiesen. Aufgrund von Koelution nicht auswertbare Signale wurden als nicht auswertbar klassifiziert. Substanzen mit Gehalten über dem Arbeitsbereich, für die aufgrund der quadratischen Regressionsfunktion keine Zahlenwerte berechnet werden konnten, wurden als nicht erfassbar verzeichnet.

Der komplette Ablauf der Vorbereitung des Equipments, der Probenahme der Atemluft- und Blindwertproben, des Transports und der Analytik ist noch einmal zusammenfassend im Anhang A.6 (Seite A-72) aufgeführt. Die statistische Auswertung der Analysenergebnisse für die Atemluftproben in Gassammelrohren mit dem Ziel der Biomarkeridentifizierung ist in Kapitel 4.2 beschrieben.

Im nächsten Unterkapitel werden die Untersuchungen an den Atemluftproben in den Probenahmeröhrchen vorgestellt.

3.4.4 Qualitative Analyse von Atemluft in adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen

Im Rahmen der Studie wurde neben Atemluftproben in Gassammelrohren auch Atemluft in Probenahmeröhrchen analysiert.

Probenahme und HS-SPME-GC-MS-Analyse von Atemluftproben mit Probenahmeröhrchen

Die Probenahme von Atemluft mit Probenahmeröhrchen für die instrumentelle VOC-Analyse wurde sowohl für Lungenkrebspatienten als auch für gesunde Studienteilnehmer durchgeführt. Entsprechend dem entwickelten Probenahmeprotokoll (vgl. Kapitel 3.4.1) erfolgte die Atemluftprobenahme durch langsames, maximales Ausatmen durch das Probenahmeröhrchen, nachdem zuvor tief eingeatmet worden war. Diese Proben wurden mittels HS-SPME-GC-MS analysiert; die Extraktion erfolgte mit einer Car/PDMS-Faser (75 µm) für 1 h bei Raumtemperatur. Zusätzlich zu den Probenahmeröhrchen mit Atemluft wurden auch nicht-beatmete Probenahmeröhrchen untersucht.

Da zu Beginn der Atemluftprobenahme von Studienteilnehmern der Lagerversuch mit den Probenahmeröhrchen (vgl. Kapitel 3.2.2) noch nicht abgeschlossen war, wurden die Probenahmeröhrchen zunächst mit Silikon-Septen ausgerüstet. Später erfolgte dann der Einsatz von Silikon/PTFE-Septen; nur diese Proben wurden in der Auswertung berücksichtigt, so dass deutlich weniger Patientenproben betrachtet wurden, als bei den Atemluftproben in Gassammelrohren.

Für die Auswertung erfolgte die Berücksichtigung von Atemluftproben der Studienteilnehmer, die bereits bei der Auswertung der Proben in den Gassammelrohren betrachtet wurden, vorausgesetzt, es waren Silikon/PTFE-Septen in den Verschlüssen eingesetzt. Die HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme wurden ausgewertet, indem für die Zielsubstanzen die Ermittlung der Signalflächen im SIM-Chromatogramm erfolgte. In die Auswertung wurden Atemproben von Patienten (n=18) und Probanden (n=23) sowie unbeatmete Probenahmeröhrchen (n=12) einbezogen. Für jede dieser drei Gruppen erfolgte die Berechnung der mittleren Signalfläche sowie der relativen Standardabweichung (Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert). Darüber hinaus wurde ein Mann-Whitney-U-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ durchgeführt, um die Ergebnisse der Atemluftproben von Patienten und Gesunden mit dem Blindwert sowie untereinander zu vergleichen. Die Darstellung und die Diskussion der Ergebnisse befinden sich in Kapitel 4.2.7.

Auftragsanalysen von Probenahmeröhrchen mit SPME-GC-CIMS-Technik

Die GWT-TUD GmbH hat sich auf die qualitative VOC-Analytik in verschiedenen Matrices mittels HS-SPME-GC-MS spezialisiert. Der besondere Aspekt war, dass der Detektion im MS anstelle einer Elektronenstoßionisation (EI) eine chemische Ionisation (CI) mit Wasser vorausging. Das CI-Gas wurde dazu direkt in eine Ionenfalle im MS eingeführt. Anhand einer einzelnen Untersuchung sollte geprüft werden, ob sich durch Anwendung dieser Messtechnik für die Atemluftanalytik substantielle Vorteile ergeben könnten. Dafür wurden ein unbeatmetes Probenahmeröhrchen, eine Atemluftprobe eines Lungenkrebspatienten und eine Atemluftprobe eines gesunden Studienteilnehmers (jeweils mit einem Probenahmeröhrchen genommen) mittels HS-SPME-GC-CIMS von der GWT-TUD GmbH untersucht und qualitativ ausgewertet. Darüber hinaus erfolgte eine zusätzliche Untersuchung der Blindwertprobe am selben System mit EI. Details zur Durchführung sind im Anhang A.5 angegeben.

In der Blindprobe konnten 555 Signale, in der Patientenprobe 546 Signale und in der Probe des Gesunden 515 Signale identifiziert werden. Die Identifizierung von Signalen mit geringer Intensität ist allerdings stark unsicherheitsbehaftet, so dass im Weiteren nur Signale mit einer Fläche von minimal 100 counts berücksichtigt wurden. Insgesamt erfolgte die Identifizierung von 577 verschiedenen Substanzen in den drei Proben. Die starke Grundbelastung des nicht-beatmeten Probenahmeröhrchens, die bereits in den eigenen Untersuchungen beobachtet worden war (Kapitel 3.2.2), wurde hier bestätigt. Es konnten Substanzen detektiert werden, die auch bereits bei den eigenen Untersuchungen identifiziert wurden, wie z. B. gesättigte und ungesättigte, unverzweigte und verzweigte, nicht-cyclische und cyclische Kohlenwasserstoffe, sauerstoffhaltige, stickstoffhaltige, schwefelhaltige und halogenhaltige Spezies sowie Siloxane. Allerdings wurde bei der Auftragsanalyse eine deutlich höhere Anzahl an Substanzen gefunden. Zusätzlich konnten vor allem niedermolekulare, anorganische Gase detektiert werden. Dies hängt damit zusammen, dass die in der Auftragsanalyse angewendete MS-Detektion auch Fragmente mit m/z 25 u, und nicht erst ab m/z 35 u, aufzeichnete.

Von den detektierten Verbindungen konnten 62 Substanzen ausschließlich in der Patientenprobe und 63 Substanzen ausschließlich in der Atemprobe des Gesunden beobachtet werden. Eine Liste dieser unikaten Substanzen findet sich im Anhang (Anhang Tabelle 36, Seite A-51). Bei näherer Betrachtung der identifizierten Substanzen ist zu erkennen, dass sich darunter auch viele exogene Substanzen wie chlorhaltige Verbindungen befinden sowie Aromastoffe, die mit Lebensmittelkonsum und Einsatz von Kosmetika assoziiert sind. Diese Substanzen sind als potentielle Biomarker für die Lungenkrebsdetektion ungeeignet.

Im Vergleich von EI- und CI-Chromatogramm des unbeatmeten Röhrchens wurde deutlich, dass bei Anwendung von CI deutlich mehr Signale mit weitaus höheren Signalintensitäten detektiert wurden (Anhang Abbildung 14, Seite A-52). Dieser Unterschied konnte allerdings zumindest teilweise auf die wiederholte Extraktion der gleichen Probe zurückgeführt werden, wodurch mit einer Signalerniedrigung zu rechnen war.

Auf Basis der Analysen von zwei Atemproben und einer Blindwertprobe können keine Aussagen im Hinblick auf potentielle Biomarker getroffen werden. Allerdings wurde anhand der Fülle der identifizierten Signale ersichtlich, dass durch Anwendung dieser CIMS-Technik in Verbindung mit der Dekonvolution der erhaltenen Massenspektren Ergebnisse mit höherem Informationsgehalt erzeugt wurden. Im Weiteren wäre natürlich auch für diese Messtechnik zu klären, ob ausschließlich ein qualitativer Vergleich möglich ist oder auch quantitativ gearbeitet werden könnte, um so potentielle Biomarker zu identifizieren.

3.4.5 Qualitative VOC-Analyse von Lungengewebeproben

Das Ethikvotum zur BIOAIR-Studie schloss die Möglichkeit ein, Lungengewebe von Lungenkrebspatienten zu analysieren. Dieser Probenotyp war verfügbar, wenn Lungenkrebspatienten im Rahmen ihrer Therapie operiert wurden. Dabei erfolgte im Allgemeinen die Entnahme eines Lungenlappens oder eines Lungenflügels, so dass neben dem eigentlichen Tumor auch pathologisch unauffälliges Gewebe reseziert wurde. Gewebe, welches nicht für die histopathologische Untersuchung benötigt wurde, konnte für die qualitative VOC-Analyse mit HS-SPME-GC-MS eingesetzt werden.

Es erfolgte kein Transport von Probenmaterial zur BAM, sondern die Beprobung des Lungengewebes fand in den kooperierenden Kliniken in der Pathologie statt. Dafür wurden je ca. 0,5-1,0 cm³ Tumorgewebe und unauffälliges Lungengewebe, welches möglichst weit entfernt vom Tumor entnommen wurde, verwendet (Abbildung 42).

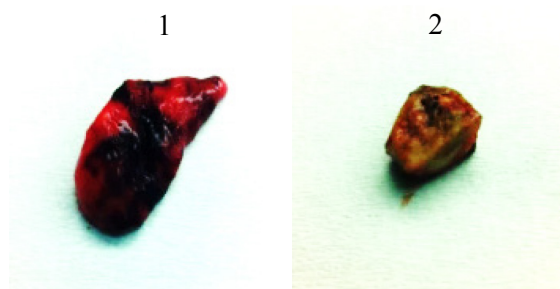


Abbildung 42: Reseziertes Lungengewebe; 1: unauffälliges Gewebe, 2: Tumorgewebe

Insgesamt konnten Gewebeproben von fünf Lungenkrebspatienten untersucht werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Tumorart und Einwaage der Gewebeproben von fünf Lungenkrebspatienten

Patientencode	OP Patient 1	OP Patient 2	OP Patient 3	OP Patient 4	OP Patient 5
Tumorart	PEC	AC	AC	PEC	AC
Einwaage G / g	0,3	0,6	0,9	1,1	0,7
Einwaage T / g	0,5	0,3	0,3	0,4	2,1

G: pathologisch unauffälliges Gewebe, T: Tumorgewebe, AC: Adenokarzinom, PEC: Plattenepithelkarzinom

Die Gewebeproben wurden in HS-Vials eingebracht. Die SPME erfolgte mit einer Car/PDMS-Faser (75 µm) für 15 min bei Raumtemperatur. Die Extraktionszeit wurde dabei analog zu den Bedingungen der *in-situ*-SPME in Lungenadenokarzinomzellkulturen (vgl. Kapitel 3.3) ausgewählt. Während der Extraktion wurde der manuelle SPME-Halter auf dem HS-Vial durch einen Adapter stabilisiert (Abbildung 43). Die beladenen SPME-Fasern wurden zur BAM transportiert und dort im Injektor des GC-MS-Systems thermodesorbiert, worauf die Trennung und Detektion der extrahierten Substanzen folgte. Im Anschluss wurde für jede Faser eine Qualitätskontrollstandardanalyse durchgeführt, um gegebenenfalls vorhandene Unterschiede in der Extraktionseffizienz erkennen zu können. Weitere Details zur Durchführung sind in Anhang A.5 dargelegt. Die Auswertung zu diesen Untersuchungen befindet sich in Kapitel 4.2.7.



Abbildung 43: HS-SPME-Extraktion von Lungengewebeproben

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse zu dem *in-vitro*-Zellmodell vorgestellt. Danach folgt die Auswertung der VOC-Untersuchungen in Atemluftproben von Lungenkrebskranken im Vergleich zu Gesunden mit der Ableitung potentieller Biomarker unter Anwendung statistischer Verfahren. Inbegriffen sind die Analysen von Atemluftproben in Probenahmeröhrchen sowie von reseziertem Lungengewebe. Abschließend erfolgen der Vergleich der Zellkulturen mit Realproben und die Bewertung der Eignung des Zellkulturmodells für die Biomarkersuche in Atemluft.

4.1 VOC-Profile von drei *in-vitro*-Lungenadenokarzinomzelllinien

Die Arbeit mit Humanproben bringt diverse erschwerende Rahmenbedingungen mit sich. Zunächst einmal muss für die Untersuchung solcher Proben zu Forschungszwecken ein positives Ethikvotum vorliegen. Darüber hinaus stellt der Umgang mit Patientendaten und -material hohe Anforderungen hinsichtlich Patientensicherheit und Datenschutz. Ferner kann die Probenverfügbarkeit, z. B. durch die Teilnahmewilligkeit der potentiellen Studienteilnehmer und die Anzahl der zumutbaren Probenahmen, eingeschränkt sein. Die Arbeit mit humanem Material kann eine hohe Schwankungsbreite der Analysenergebnisse aufgrund individueller Lebensumstände bedingen. Vor allem für die Atemluftanalytik ist der Einfluss vieler, mit dem Individuum und der Probenahme assoziierter Faktoren bekannt (vgl. Kapitel 2.3.1).

Da die interindividuellen Schwankungen ein großer Störfaktor bei der Biomarkersuche in Atemluft sein können, wurden Lungenkrebszellkulturen als *in-vitro*-Modell für Lungenkrebs angewendet. Die Anzucht der Zellkulturen erfolgt nach standardisierten Verfahren durch die EPO GmbH.

In einem Vorversuch mit der kommerziell erhältlichen Lungenadenokarzinomzelllinie A549 zeigte sich, dass eine direkte Einbringung der SPME-Faser in eine Zellkulturflasche (*in-situ*-SPME) mit anschließender GC-MS-Analyse eine Untersuchung des VOC-Profils zulässt (vgl. Kapitel 3.3.1). Aufbauend auf dem Vorversuch wurde ein Analytspektrum mit mehr als 60 Substanzen ausgewählt, die im Chromatogramm detektiert werden konnten und als potentielle Kandidaten eingestuft wurden. Dabei handelte es sich im Wesentlichen um n-Alkane und einfach methylierte Alkane, Aromaten, n-Aldehyde und Alkohole. Es erfolgte eine Ergänzung dieser Liste um einige wenige verzweigte Alkene und Aldehyde, die in Publikationen als charakteristisch für Lungenkrebszellen *in vitro* benannt worden waren (vgl. Tabelle 1, ab Seite 8).

Zielsetzung der weiterführenden Arbeiten war die Quantifizierung der VOC in der Zellkultur sowie in zellfreiem Nährmedium mit *in-situ*-SPME-GC-MS, um daran anschließend durch Vergleich dieser Proben potentielle, für Lungenkrebs spezifische Biomarker identifizieren zu können. Dieser Vergleich sollte für alle drei zur Verfügung stehenden Lungenadenokarzinomzellkulturen A549, Lu7387 und Lu7466 (vgl. Tabelle 11, Seite 40) durchgeführt werden. Bevor jedoch die Analysendaten für die Zelllinien vorgestellt und diskutiert werden, erfolgt eine Betrachtung des VOC-Eintrags durch die für die Zellkultivierung eingesetzten Kulturflaschen.

4.1.1 Leerwert von Zellkulturflaschen

Die Zellkultivierung wurde in Einwegkulturflaschen aus Polystyren durchgeführt. Diese Zellkulturflaschen sind ein Standardmaterial für die Kultivierung. Das Design soll gemäß Herstellerangaben ein platzsparendes Stapeln der Flaschen erlauben. Die innere Oberfläche ist so konzipiert, dass sie ideal für die Ansiedlung von Zellen geeignet sein soll. Diese Materialien werden bereits vor der Auslieferung sterilisiert und nach einmaligem Gebrauch entsorgt, so dass das Kontaminationsrisiko mit Mikroorganismen minimiert wird. Andererseits ist es sehr wahrscheinlich, dass das Polymermaterial VOC wie z. B. Restmonomere, Additive und Nebenprodukte emittiert, welche die Analyse des VOC-Profils

der Zellkulturen beeinflussen können. Aus diesem Grund wurde von unbenutzten Zellkulturflaschen der VOC-Hintergrund mit *in-situ*-SPME-GC-MS qualitativ analysiert.

Das mit HS-SPME-GC-MS analysierte VOC-Profil von neuen Zellkulturflaschen enthielt Alkane, Aromaten und weitere bereits im Vorversuch für die A549-Zellkultur beobachtete Substanzen (Abbildung 44). Einige davon waren biogen, wie z. B. n-Butanal und Ethylacetat, die von den Zellen metabolisiert oder emittiert werden könnten. Aber es konnten auch nicht-biogene VOC wie z. B. Dichlormethan beobachtet werden. Es ist unklar, inwiefern diese Hintergrundbelastung während der Zellkultivierung konstant bleibt.

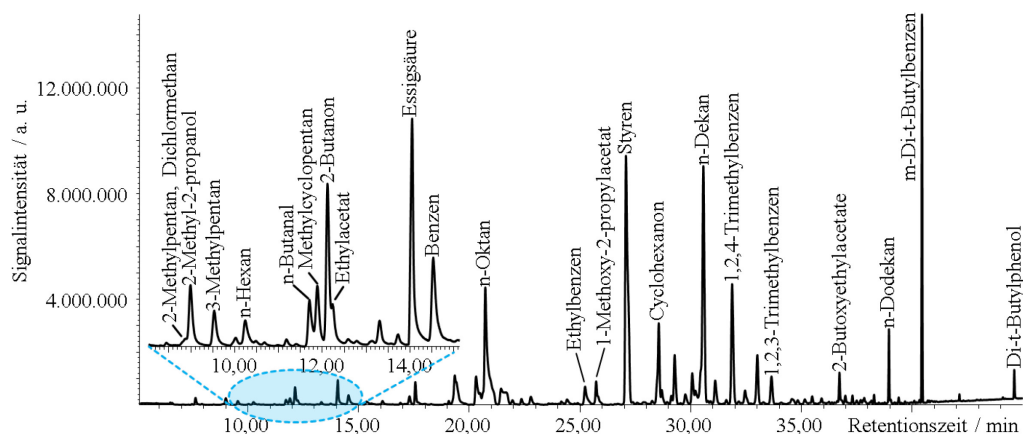


Abbildung 44: *In-situ*-SPME-GC-MS-Chromatogramm einer leeren Zellkulturflasche zur Ermittlung des VOC-Hintergrundprofils

Bereits andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit dem VOC-Eintrag von Einwegzellkulturflaschen. Zimmermann *et al.* [176] untersuchten humane Darmzellen und verwendeten aufgrund dieser Hintergrundproblematik Kulturgefäße aus Glas. Kwak *et al.* [177] untersuchten Zellkulturen mit Melanomzelllinien und analysierten zur Vermeidung des VOC-Eintrags durch die Kulturgefäße nur die Zellkulturflüssigkeit. Jedoch zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass auch in der separierten Kulturflüssigkeit Dichlormethan und Styren detektiert werden konnten (vgl. Kapitel 4.1.3), die sehr wahrscheinlich aus dem Material der Zellkulturflaschen stammen.

Um eine geeignete Grundlage für eine Kalibrierung der *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik zu erhalten, wurde der Hintergrund der leeren Zellkulturflaschen durch Einbringung von Aktivkohle reduziert (vgl. Kapitel 3.3.2). Damit wurden die Zellkulturflaschen vorbereitet, die für die Kalibrierung zum Einsatz kamen. Jedoch blieb eine signifikante Hintergrundbelastung bestehen und es ist nicht bekannt, ob eine kontinuierliche VOC-Emission diese wieder erhöhen könnte. Ferner konnte die Reinigung nicht für die eigentliche Zellkultivierung eingesetzt werden, da die daraus resultierenden nicht-sterilen Bedingungen sich negativ auf das Zellwachstum auswirken könnten. Demnach sind alle nachfolgend dargestellten quantitativen Daten als Näherungswerte zu betrachten.

4.1.2 Vergleich der quantitativ analysierten VOC-Profile

Die Analyse der VOC-Gehalte in den Zellkulturen mit Zelllinien sowie in zellfreiem Nährmedium sollte als Grundlage dienen, um potentielle Biomarkerkandidaten zu identifizieren, die spezifisch für Lungenkrebs sind.

Für die Untersuchungen wurde die entwickelte Methode bestehend aus *in-situ*-SPME mit Car/PDMS-Faser für 15 min im Brutschrank bei 37 °C in Kombination mit GC-MS eingesetzt. Zunächst soll auf die substanz- und faserspezifische Kalibrierung eingegangen werden. Die Konzentrationsangabe in der Einheit $\mu\text{g-Zellkulturflasche}^{-1}$ ergab sich, weil die detektierten VOC aus allen Kompartimenten – Zellen, Medium, Kulturgefäß – stammen können. Folglich kann kein traditionelles Referenzsystem für die Quantifizierung, wie z. B. der Bezug auf eine definierte Masse, Volumen,

Oberfläche oder Zellzahl, angegeben werden. Aus diesem Grund ergibt sich als Konzentrationseinheit Menge VOC je Zellkulturflasche analysiert im Gasraum der Zellkultur.

Die meisten Substanzen konnten mit linearen Funktionen ausgewertet werden, wohingegen für neun VOC ein quadratisches Regressionsmodell notwendig war (Abbildung 45). Für die kurz- und mittelkettigen VOC ergaben sich zufriedenstellende Bestimmtheitsmaße mit Werten von 0,96 oder höher (Anhang Tabelle 29, Seite A-35). Für neun schwerer flüchtige Substanzen ergab sich für mindestens eine der sechs Fasern eine niedrigere Regressionsgüte; für diese Substanzen wurden bereits bei den Untersuchungen zum Faservergleich und der simulierten Faserlagerung erhöhte Streuungen beobachtet (vgl. Kapitel 3.3.2). Folglich konnte die hier angewendete *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik für viele Substanzen angewendet werden, war jedoch nicht geeignet, um diese neun Stoffe quantitativ zu erfassen. Es fand keine Quantifizierung dieser VOC in den Proben statt; ferner erfolgte aufgrund der Überbefunde für Pyrrol und Phenol bei der simulierten Faserlagerung (vgl. Abbildung 35 Seite 48 und Anhang Tabelle 28 Seite A-33) keine Auswertung.

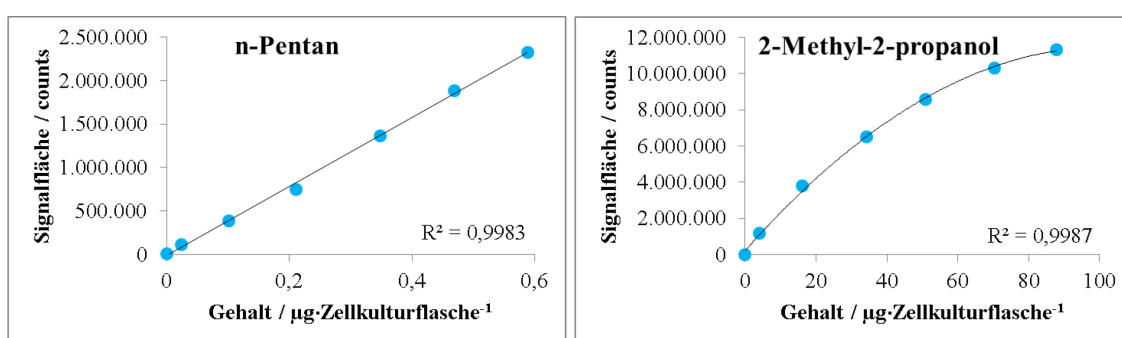


Abbildung 45: Beispiele für Kalibrierfunktionen für die *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik in Zellkulturflaschen für n-Pentan und 2-Methyl-2-propanol; R^2 : Bestimmtheitsmaß

Nach erfolgreicher Durchführung der Kalibrierung konnten die Zellkulturen mit den drei Zelllinien sowie den korrespondierenden zellfreien Nährmedien analysiert werden. Die ermittelten Signalflächen wurden mit der faser- und substanzspezifischen Kalibrierfunktion in Gehalte umgerechnet. Die für die weitere Auswertung zugrunde gelegten Formeln sind auf Seite A-38 angegeben. Falls für alle Analysen einer Drei- bzw. Sechsfachbestimmung (Nährmedium für die Zelllinien Lu7387 und Lu7466) die Gehalte für eine Substanz größer als die Nachweisgrenze waren, erfolgte die Angabe des Ergebnisses in der Form des Mittelwerts \bar{x} und der Standardunsicherheit des Mittelwertes $u_{\bar{x}}$. Falls mindestens ein Messwert eines Ansatzes nicht nachweisbar war, wurde der Lageparameter A ermittelt sowie die Standardunsicherheit u_A . Dabei erfolgt die Konsolidierung der Daten über die Zuweisung adäquater Unsicherheiten in Anlehnung an das von Bremser [178] beschriebene Verfahren (vgl. Anhang A.4, Seite A-39). Im Weiteren wurde ein Vergleich der VOC-Gehalte zwischen Ansätzen mit Lungenadenokarzinomzellkulturen und korrespondierenden Nährmedien durch Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ durchgeführt.

In Tabelle 14 sind die Quantifizierungsergebnisse für alle drei untersuchten Adenokarzinomzelllinien und die zugehörigen zellfreien Nährmedien sowie die sich daraus ableitenden Trends angegeben. Dabei war für vier Zielanalyten – 2,4-Dimethyl-1-hepten, n-Hexanal, n-Oktanal und Cyclohexanon – eine Auswertung aufgrund von Koelution mit Matrixbestandteilen in keiner der untersuchten Proben möglich.

Alle Zellkulturen und Nährmediumproben wiesen Ähnlichkeiten auf, wie z. B. die dominierenden Gehalte von Ethanol, Aceton und Cyclohexanol. Ein Vergleich der hier bestimmten Gehalte mit Literaturdaten ist schwierig, da die Gehalte entweder als ppb_V-Werte angegeben [99] oder Signalflächen verglichen wurden [95]. Der große Anteil an Ethanol am VOC-Profil von A549-Zellen wurde bereits in der Literatur berichtet; andererseits erfolgte für Butylacetat und 3-Methylbutanal in der Publikation [99] die Angabe hoher Konzentrationen, während mit den hier durchgeführten Analysen

nur sehr geringe Gehalte feststellbar waren. Diese Unterschiede könnten in der Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien begründet sein.

Für die A549-Zellkultur konnte bei acht von 15 untersuchten Alkanen eine Gehaltniedrigung im Vergleich zum zellfreien Nährmedium beobachtet werden. Demgegenüber war kein vergleichbarer Trend für die Zelllinien Lu7387 und Lu7466 ersichtlich. Die für die Zelllinie A549 festgestellte Minderung des n-Oktangehalts steht im Widerspruch zur beschriebenen Freisetzung in der Literatur [99]. Gegebenenfalls ist dieser Unterschied in der Verwendung unterschiedlicher Kulturgefäße begründet. Die für die hier durchgeführten Untersuchungen verwendeten Einwegkulturflaschen aus Polystyren besaßen einen nicht vernachlässigbaren VOC-Hintergrund (vgl. Kapitel 4.1.1), in dem unter anderem die Substanz n-Oktan mit hoher Signalintensität feststellbar war. In der benannten Literaturstelle hingegen wurde mutmaßlich ein Glasgefäß für die Zellkultivierung eingesetzt (analog zu [97]), welches sehr wahrscheinlich nicht zu einem Eintrag von n-Oktan geführt hat. Es ist davon auszugehen, dass der Zellmetabolismus von den zur Verfügung stehenden Substanzen abhängt und entsprechend Aufnahme oder Freisetzung von VOC durch die vorhandenen Stoffe beeinflusst werden kann.

Für A549-Zellen war eine Reduktion des Gehalts von fünf Aromaten und eine Konzentrationserhöhung für Styren im Vergleich zum Nährmedium zu beobachten. Aromatische Strukturen können im Rahmen des Phase-I-Metabolismus funktionalisiert werden [179, 180], so dass eine Gehaltsabnahme vorstellbar wäre. Auch wenn Reaktionen des Phase-I-Metabolismus primär mit der Leber assoziiert werden, sind in Lungenepithelzellen entsprechende Cytochrom P450-Enzyme nachweisbar [181]. Die Freisetzung von Styren hingegen könnte gegebenenfalls auf eine verstärkte Mobilisierung von Restmonomer aus der Zellkulturflasche zurückzuführen sein; Styren war mit hohen Signalintensitäten bereits in leeren Zellkulturflaschen detektiert worden (Abbildung 44, Seite 64).

Für die meisten auswertbaren Aldehyde konnte durch alle drei Lungenadenokarzinomzelllinien eine Gehaltsreduktion im Vergleich zum zellfreien Nährmedium ermittelt werden. Ausnahmen waren nur für n-Heptanal und 3-Methylbutanal zu beobachten. Die Aldehydreduktion durch die Zellen stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen für A549-Zellen [99, 100, 103] und für weitere Lungenadenokarzinomzelllinien [97, 101] überein.

Gleichermaßen wurde der 1-Propanolgehalt in den Kulturen aller drei Zelllinien erhöht. Ferner zeigte sich für die A549-Zellen ein Anstieg für 2-Propanol, während bei der Lu7387-Zelllinie eine Erhöhung für Cyclohexanol und 2-Ethyl-1-hexanol beobachtet werden konnte. Eine Beeinflussung dieser Alkohole durch *in-vitro*-Lungenadenokarzinomzelllinien wird hier zum ersten Mal berichtet. Jedoch konnte bereits bei reseziertem Lungengewebe ein erhöhter Gehalt an Alkoholen in Tumorgewebe gegenüber pathologisch unauffälligem Gewebe beobachtet werden [53].

Zusammenfassend konnte nur für wenige VOC – einige Aldehyde und 1-Propanol – ein gleichartiger Einfluss aller drei Lungenadenokarzinomzelllinien ermittelt werden. Damit könnte es sich bei diesen Substanzen um potentielle Biomarkerkandidaten handeln. Die Diskussion ihrer Eignung erfolgt nach Betrachtung der Ergebnisse für die alternativen Probenahmeverfahren.

4.1.3 Einfluss verschiedener Probenahmeverfahren auf das VOC-Profil

Für die Analyse des VOC-Profiles von Zellkulturen mit der SPME-Technik können verschiedene Probenahmeverfahren angewendet werden. Neben der bisher durchgeführten *in-situ*-SPME-Extraktion kann das VOC-Profil durch HS-SPME in Teilproben (Kulturflüssigkeit, Gasphase) oder auch in für die Probenahme eingesetzten adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen untersucht werden (vgl. Kapitel 3.3.3). Ob diese verschiedenen Verfahren Einfluss auf das ermittelte VOC-Profil haben, wurde in der betrachteten Literatur bisher nicht beschrieben. Aus diesem Grund sollte zunächst ein theoretischer Vergleich dieser verschiedenen Verfahren vorgenommen werden, an den sich eine praktische Untersuchung durch Anwendung aller Probenahmeverfahren auf die drei zur Verfügung stehenden Lungenadenokarzinomzelllinien anschloss.

Tabelle 14: VOC-Gehalte in µg-Zellkulturf flasche⁻¹ von Adenokarzinomzellkulturen bestimmt im HS mit *in-situ*-SPME-GC-MS-Analyse
Dargestellt sind Mittelwert ± Unsicherheit oder Lageparameter ± Unsicherheit; Anzahl der Analysen über LOD sind in Klammern vermerkt, wenn es weniger als n=3 bzw. n=6 Analysen sind.

Substanz	NM A549 (n=3)	A549 (n=3)	Trend	NM Lu (n=6)	Lu7466 (n=3)	Trend	Lu7387 (n=3)	Trend
n-Pentan	0,499 ± 0,047	0,022 ± 0,002	↓	0,023 ± 0,002	0,025 ± 0,002	→	0,021 ± 0,002	→
n-Hexan	0,9 ± 0,1	0,29 ± 0,02	→	0,172 ± 0,008	0,175 ± 0,006	→	0,141 ± 0,004	→
n-Heptan	0,074 ± 0,008	n. d.	↓	n. d.	0,004 ⁽¹⁾	→	n. d.	→
n-Oktan	7,1 ± 0,3	3,4 ± 0,2	↓	3,32 ± 0,08	3,4 ± 0,1	→	3,21 ± 0,05	→
n-Nonan	0,014 ± 0,001	0,005 ± 0,001	↓	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	→	0,005 ± 0,001	→
n-Dekan	2,8 ± 0,2	3,2 ± 0,3	→	2,20 ± 0,06	2,3 ± 0,2	→	2,5 ± 0,2	→
2-Methylbutan	n. d.	n. d.		n. d.	n. d.		n. d.	
2-Methylpentan	0,023 ± 0,006	0,005 ± 0,002	→	n. d.	0,004 ⁽¹⁾	→	0,006 ⁽¹⁾	→
3-Methylpentan	0,68 ± 0,07	0,093 ± 0,004	↓	0,065 ± 0,003	0,052 ± 0,003	→	0,067 ± 0,002	→
2-Methylhexan	0,002 ± 0,001 ⁽²⁾	n. d.	→	n. d.	n. d.		n. d.	
3-Methylhexan	0,092 ± 0,009	0,001 ⁽¹⁾	↓	n. d.	0,0005 ⁽¹⁾	→	n. d.	
3-Methylheptan	n. a.	0,192 ± 0,006		0,204 ± 0,004	0,188 ± 0,005	→	0,184 ± 0,002	→
3-Methylnonan	0,15 ± 0,02	0,099 ± 0,006	→	0,073 ± 0,002	0,071 ± 0,004	→	0,074 ± 0,003	→
Cyclohexan	0,028 ± 0,004	0,002 ⁽¹⁾	↓	0,005 ± 0,001 ⁽⁴⁾	0,002 ⁽¹⁾	→	0,007 ± 0,001	→
Methylcyclopentan	0,66 ± 0,08	0,21 ± 0,02	↓	0,155 ± 0,008	0,120 ± 0,006	→	0,162 ± 0,006	→
2-Methyl-1-penten	0,009 ± 0,001	0,001 ⁽¹⁾	↓	n. d.	n. d.		n. d.	
2,4-Dimethyl-1-hepten	n. a.	n. a.		n. a.	n. a.		n. a.	
Benzen	0,037 ± 0,002	0,005 ± 0,001	↓	0,007 ± 0,001	0,005 ± 0,001	→	0,004 ± 0,001	→
Ethylbenzen	0,067 ± 0,003	0,026 ± 0,003	↓	0,031 ± 0,001	0,030 ± 0,002	→	0,030 ± 0,001	→
n-Propylbenzen	0,019 ± 0,001	0,029 ± 0,003	→	0,023 ± 0,001	0,023 ± 0,002	→	0,023 ± 0,001	→
o-Xylen	0,012 ± 0,001	0,003 ± 0,001	↓	0,016 ± 0,001	0,015 ± 0,001	→	0,020 ± 0,001	→
m/p-Xylen	0,031 ± 0,001	0,007 ± 0,001	↓	0,029 ± 0,001	0,026 ± 0,001	→	0,033 ± 0,001	→
1-Ethyl-2-methylbenzen	0,035 ± 0,002	0,056 ± 0,006	→	0,045 ± 0,001	0,048 ± 0,003	→	0,048 ± 0,003	→
1-Ethyl-3-methylbenzen	0,049 ± 0,002	0,085 ± 0,007	→	0,066 ± 0,002	0,069 ± 0,004	→	0,067 ± 0,003	→
1-Ethyl-4-methylbenzen	0,023 ± 0,001	0,046 ± 0,005	→	0,036 ± 0,001	0,037 ± 0,002	→	0,037 ± 0,001	→
Mesitylen	0,026 ± 0,002	0,045 ± 0,004	→	0,037 ± 0,001	0,039 ± 0,003	→	0,039 ± 0,002	→
Styren	0,42 ± 0,02	0,81 ± 0,02	↑	0,65 ± 0,01	0,60 ± 0,05	→	0,60 ± 0,03	→
Cumen	0,007 ± 0,001	0,002 ± 0,001	↓	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	→	0,002 ± 0,001	→

↑, ↓: signifikanter Trend (einfaktorielle ANOVA mit Signifikanzniveau 0,05), n. d.: nicht detektierbar (< LOD), n. a.: nicht auswertbar (Koelution)

NM A549: Nährmedium Ham's F12, NM Lu: Nährmedium DMEM/ Ham's F-12

Tabelle 14 (Fortsetzung): VOC-Gehalte in µg-Zellkulturf flasche⁻¹ von Adenokarzinomzellkulturen bestimmt im HS mit *in-situ*-SPME-GC-MS-Analyse
Dargestellt sind Mittelwert ± Unsicherheit oder Lageparameter ± Unsicherheit; Anzahl der Analysen über LOD sind in Klammern vermerkt, wenn es weniger als n=3 bzw. n=6 Analysen sind.

Substanz	NM A549 (n=3)	A549 (n=3)	Trend	NM Lu (n=6)	Lu7466 (n=3)	Trend	Lu7387 (n=3)	Trend
Acetophenon	0,62 ± 0,08	0,32 ± 0,04	→	0,81 ± 0,02	0,81 ± 0,04	→	0,22 ± 0,02	→
Propanal	0,269 ± 0,005	0,029 ± 0,007 ⁽²⁾	↓	0,121 ± 0,007	0,07 ± 0,01	→	0,054 ± 0,005	↓
n-Butanal	0,177 ± 0,002	0,011 ± 0,002 ⁽²⁾	↓	0,061 ± 0,004	0,009 ± 0,002	↓	0,005 ± 0,001	↓
n-Pentanal	0,088 ± 0,001	0,008 ± 0,002	↓	0,035 ± 0,002	0,007 ± 0,001	↓	0,004 ± 0,002	↓
n-Hexanal	n. a.	n. a.	→	n. a.	n. a.	→	n. a.	→
n-Heptanal	0,037 ± 0,003	0,021 ± 0,003	→	0,025 ± 0,002	0,010 ± 0,001	↓	0,011 ± 0,002	↓
n-Oktanal	n. a.	n. a.	↓	n. a.	n. a.	→	n. a.	→
3-Methylbutanal	0,68 ± 0,02	n. d.	↓	n. d.	n. d.	→	n. d.	→
2-Methyl-2-propenal	0,011 ± 0,001	0,002 ⁽¹⁾	↓	0,002 ± 0,001	n. d.	↓	n. d.	↓
2-Methyl-2-butanal	0,011 ± 0,001	n. d.	↓	0,007 ± 0,001	0,005 ± 0,001	↓	n. d.	↓
Ethanol	432 ± 11	462 ± 40	→	467 ± 26	620 ± 40	→	484 ± 54	→
1-Propanol	0,6 ± 0,2 ⁽²⁾	20 ± 2	↑	38 ± 3	59 ± 4	↑	54,1 ± 0,7	↑
2-Propanol	2,3 ± 0,3	5,3 ± 0,5	↑	11,1 ± 0,8	15,9 ± 0,8	→	11,0 ± 0,3	→
1-Butanol	n. d.	0,322 ⁽¹⁾	→	0,27 ± 0,02	0,22 ± 0,05	→	0,21 ± 0,05	→
2-Methyl-2-propanol	2,1 ± 0,3	1,85 ± 0,03	→	3,5 ± 0,2 ⁽⁴⁾	1,3 ± 0,2	→	0,230 ⁽¹⁾	→
2-Ethyl-1-hexanol	0,98 ± 0,09	1,5 ± 0,2	→	0,64 ± 0,04	0,62 ± 0,08	→	0,55 ± 0,09	↑
Cyclohexanol	8,7 ± 0,3	12,7 ± 0,8	→	8,4 ± 0,2	8,8 ± 0,4	→	11,2 ± 0,4	↑
Aceton	18,2 ± 0,4	11,5 ± 0,7	↓	9,4 ± 0,3	9,5 ± 0,4	→	10,0 ± 0,3	→
2-Butanon	0,68 ± 0,03	1,0 ± 0,1	→	1,4 ± 0,2	2,17 ± 0,09	→	0,71 ± 0,03	→
2-Pentanon	0,056 ± 0,001	0,047 ± 0,004	→	0,033 ± 0,002	0,039 ± 0,002	→	0,037 ± 0,001	→
3-Pentanon	0,115 ± 0,001	0,064 ± 0,008	↓	0,073 ± 0,003	0,068 ± 0,003	→	0,064 ± 0,001	→
2-Hexanon	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	→	0,095 ± 0,004	0,101 ± 0,005	→	0,083 ± 0,001	→
3-Hexanon	0,073 ± 0,003	0,060 ± 0,005	→	0,054 ± 0,003	0,061 ± 0,003	→	0,052 ± 0,001	→
2-Oktanon	0,18 ± 0,04	0,39 ± 0,06	→	0,110 ± 0,007	0,159 ± 0,008	→	0,155 ± 0,005	→
Cyclohexanon	n. a.	n. a.	→	n. a.	n. a.	→	n. a.	→
Ethylacetat	0,013 ± 0,002	0,112 ± 0,006	↑	0,087 ± 0,002	0,096 ± 0,004	→	0,084 ± 0,002	→
Butylacetat	0,035 ± 0,001	0,018 ± 0,003	↓	0,027 ± 0,002	0,023 ± 0,002	→	0,018 ± 0,001	↓
Ethylbutyrat	n. d.	n. d.	→	n. d.	n. d.	→	n. d.	→
Essigsäure	n. d.	234 ⁽¹⁾	→	n. d.	n. d.	→	n. d.	→

↑, ↓: signifikanter Trend (einfaktorielle ANOVA mit Signifikanzniveau 0,05), n. d.: nicht detektierbar (< LOD), n. a.: nicht auswertbar (Koelution)

NM A549: Nährmedium Ham's F12, NM Lu: Nährmedium DMEM/ Ham's F-12

Theoretische Betrachtung der vier Probenahmeverfahren

Alle vier Probenahmeverfahren ermöglichen eine räumliche Trennung der Beprobung der Zellkultur von der GC-MS-Analytik. Die *in-situ*-SPME beschreibt, wie bereits angeführt, das komplette Volatilom der Zellkultur bestehend aus Gasphase, Kulturflüssigkeit und Zellen inklusive des Materials der Kulturflasche. Im Vergleich zum Erzeugen einer Teilprobe ist das Risiko einer Probenkontamination verringert. Die Extraktionstemperatur ist auf die Wachstumstemperatur der Zellen limitiert. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 ausgeführt, kann für dieses Probenahmeverfahren bei der Quantifizierung keine traditionelle Einheit angegeben werden, da die detektierten VOC aus allen Kompartimenten stammen können. SPME-Extraktion und GC-MS-Analyse müssen manuell durchgeführt werden, woraus sich ein hoher Zeitaufwand ergibt. Der Einsatz einer internen Standardlösung ist nicht zu empfehlen, weil auch die deuterierten Substanzen durch die Zellen metabolisiert werden können und viele organische Lösungsmittel, wie z. B. Methanol, Zellgifte sind.

Die Teilprobe Kulturflüssigkeit gewährt Zugang zum VOC-Profil des separierten Mediums und sollte somit Informationen über die stärker polaren und weniger flüchtigen Substanzen enthalten. Eine Analyse unter Einsatz eines Autosamplers ist möglich und ebenso eine Erhöhung der Extraktionstemperatur, wobei ein solches Vorgehen jedoch das Risiko der Reaktion von Bestandteilen untereinander birgt. Zugabe eines internen Standards nach vorhergehender Sterilfiltration sollte möglich sein. Eine Kühlagerung der Proben ist theoretisch möglich, allerdings müsste der Lagerungseinfluss auf das VOC-Profil überprüft werden.

Durch Untersuchung der Teilprobe Gas aus der Zellkulturflasche sollte sich der Zugang zu den flüchtigsten VOC in der Zellkultur ergeben. Vorteilhaft ist der mögliche Einsatz eines Autosamplers für die HS-SPME-GC-MS-Analyse. Durch die Probenahme (vgl. Kapitel 3.3.3) wird eine Verdünnung der Luft aus der Zellkulturflasche bedingt, die durch erhöhte Extraktionszeiten und -temperaturen zumindest teilweise ausgeglichen werden kann. Die Zugabe von einem internen Standard ist prinzipiell möglich; allerdings zeigte sich in einem diesbezüglichen Versuch, dass das eingebrachte Lösungsmittel die Gleichgewichtseinstellung zwischen SPME-Faser und Probe nachteilig beeinflusste (Anhang Abbildung 11, Seite A-41). Eine Lagerung dieser Teilprobe empfiehlt sich nicht, da für die Probenahme die Septen der Vials durchstoßen wurden; daraus ergeben sich Risiken im Hinblick auf Substanzverlust und Kontamination.

Wird die Luft aus der Zellkulturflasche in ein Probenahmeröhrchen mit Adsorbervlies appliziert, sollte, ähnlich wie für die Teilprobe Gas, der Zugang zu den flüchtigsten VOC in der Zellkultur gegeben sein. Allerdings ist zu beachten, dass das Adsorbervlies sehr wahrscheinlich das analysierbare VOC-Profil ändert; neben einer möglicherweise stattfindenden, gegebenenfalls auch selektiven, Signalreduktion einiger VOC besitzen die Vliese nachweislich eine Hintergrundbelastung (vgl. Kapitel 3.2.2). Die Zugabe von interner Standardlösung in das Probenahmeröhrchen ist, ebenso wie für die Teilprobe Gas, mit dem Risiko der Beeinflussung der Gleichgewichtseinstellung verbunden. Eine ausgedehnte Probenlagerung kann, unter Beachtung der Ergebnisse für die Lagerversuche von Probenahmeröhrchen (vgl. Abbildung 24, Seite 38), nicht empfohlen werden.

Im Weiteren erfolgt zunächst der Vergleich der qualitativen Ergebnisse, die durch Anwendung der drei Probenahmeverfahren *in-situ*-SPME, HS-SPME der Teilprobe Kulturflüssigkeit und HS-SPME der Teilprobe Gas erhalten wurden. Daran schließt sich die Auswertung des Einflusses des Adsorbervlies auf das analysierte VOC-Profil der Gasphase bei Applikation in das Probenahmeröhrchen an.

Vergleich der Analysenergebnisse für in-situ-SPME, Teilprobe Kulturflüssigkeit und Teilprobe Gas

In Abbildung 46 sind für die A549-Zellkultur die Chromatogramme für drei Probenahmeverfahren dargestellt. Es wird ersichtlich, dass für die verschiedenen Probenahmeverfahren sich teilweise deutliche Unterschiede in den Signalintensitäten der einzelnen VOC ergeben.

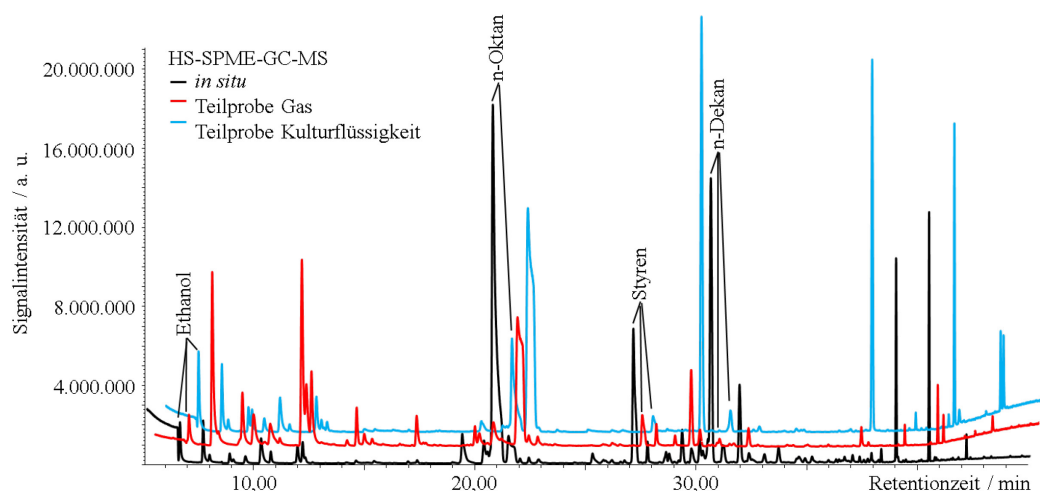


Abbildung 46: VOC-Profil der A549-Zellkultur unter Anwendung drei verschiedener HS-SPME-Probenahmeverfahren gefolgt von GC-MS-Analyse

Tabelle 15 fasst die Ergebnisse des zu beobachtenden Einflusses der Lungenkrebszellen auf das VOC-Profil der Kulturen unter Anwendung der drei verschiedenen Probenahmetechniken für 56 VOC zusammen; es erfolgt keine Angabe für Cyclohexanon, da das zugehörige Signal in allen untersuchten Proben aufgrund von Koelution nicht auswertbar war. Die Angaben für die *in-situ*-SPME entsprechen den bereits in Tabelle 14 (ab Seite 67) dargestellten Trends.

Die Teilprobe Gas wies die geringsten Intensitäten für die spät eluierenden, also schwerer flüchtigen Substanzen auf, während bei der *in-situ*-SPME und der Teilprobe Kulturflüssigkeit eine höhere Anzahl an VOC zugänglich waren; dadurch kam es allerdings auch häufiger zu Koelutionen. So konnte z. B. 3-Methylnonan im Wesentlichen nur mit der *in-situ*-SPME-Beprobung ausgewertet werden, während *n*-Hexanal und 2,4-Dimethyl-1-hepten nur in der Teilprobe Kulturflüssigkeit zugänglich waren. Im Allgemeinen fanden sich vergleichbare Trends für die VOC bei Anwendung dieser drei Probenahmeverfahren: Der Gehalt einer Substanz wurde in ein oder zwei Kompartimenten verändert, während er in den anderen Proben unverändert blieb.

Sehr interessant ist, dass für *n*-Dekan bei den A549-Zellen und für einige Aromaten bei den Zelllinien Lu7466 und Lu7387 ein Anstieg der Signalintensitäten in der Gasphase beobachtet wurde, während die Intensität bei Analyse der Teilprobe Kulturflüssigkeit abnahm. Im Gesamtsystem, welches durch die *in-situ*-SPME erfasst wird, konnte jedoch keine Gehaltsveränderung beobachtet werden. Folglich ist nicht zwingend von einer Metabolisierung dieser Substanzen durch die Zellen auszugehen, sondern es fand wahrscheinlich eine Relokalisation des Alkans und der Aromaten statt. Wenn nur die Ergebnisse für eine Teilprobe betrachtet würden, könnte fälschlicherweise von potentiellen Biomarkern ausgegangen werden, obwohl die Zellen den Gehalt dieser Substanzen nicht verändern. Demnach scheint bei Anwendung der *in-situ*-SPME das Risiko für Fehlinterpretation von Daten am geringsten zu sein.

Tabelle 15: Vergleich des Einflusses von vier HS-SPME-GC-MS-Probenahme-strategien auf die ermittelten Trends in den VOC-Profilen von drei Lungenadenokarzinomzellkulturen

	A549				Lu7466				Lu7387			
	<i>in situ</i>	Kultur-flüssigkeit	Gas-phase	Probenahme-röhrchen	<i>in situ</i>	Kultur-flüssigkeit	Gas-phase	Probenahme-röhrchen	<i>in situ</i>	Kultur-flüssigkeit	Gas-phase	Probenahme-röhrchen
n-Pentan	↓	→	↓	↓	→	n. a.	n. a.	→	→	n. a.	n. a.	→
n-Hexan	→	→	→	→	→	↑	→	→	→	↓	→	→
n-Heptan	↓	→	↓	↓	→	n. a.	n. d.	→	→	n. a.	n. d.	→
n-Oktan	↓	↓	↓	↓	→	→	↑	→	→	→	→	→
n-Nonan	↓	↓	→	↓	→	n. a.	n. d.	→	→	n. a.	n. d.	→
n-Dekan	→	↓	↑	n. a.	→	→	↑	→	→	↓	→	→
2-Methylbutan	n. d.	→	↓	↓	n. d.	↑	n. d.	→	n. d.	n. d.	n. d.	→
2-Methylpentan	→	→	→	↓	→	↑	n. d.	↑	→	↑	n. d.	→
3-Methylpentan	↓	→	↓	↓	→	↑	→	→	→	→	↑	→
2-Methylhexan	→	n. a.	↓	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.	↑	n. d.	n. d.	n. d.	→
3-Methylhexan	↓	→	↓	↓	→	↑	→	→	n. d.	n. d.	→	→
3-Methylheptan	n. a.	n. a.	n. a.	↓	→	↑	→	↑	→	→	↑	→
3-Methylnonan	→	n. a.	n. a.	→	→	n. a.	n. a.	n. a.	→	n. a.	n. a.	n. a.
Cyclohexan	↓	→	↓	↓	→	↑	→	↓	→	→	↑	→
Methylcyclopentan	↓	→	→	→	→	↑	→	→	→	↑	↑	→
2-Methyl-1-penten	↓	→	↓	↓	n. d.	↑	n. d.	↑	n. d.	↑	n. d.	→
2,4-Dimethyl-1-hepten	n. a.	→	n. d.	→	n. a.	↑	n. d.	→	n. a.	↑	n. d.	→
Benzen	↓	→	↓	↓	→	↑	→	→	→	↓	→	→
Ethylbenzen	↓	↓	→	↓	→	↓	↑	→	→	↓	↑	→
n-Propylbenzen	→	→	↑	↑	→	↓	↑	→	→	↓	↑	→
o-Xylen	↓	→	→	→	→	→	↑	→	→	→	→	→
m/p-Xylen	↓	→	→	→	→	↑	↑	→	→	→	↑	→
Mesitylen	→	→	↑	↑	→	↓	↑	→	→	↓	↑	→
1-Ethyl-2-methylbenzen	→	→	↑	↑	→	↓	↑	→	→	↓	↑	→
1-Ethyl-3-methylbenzen	→	→	↑	↑	→	↓	↑	↓	→	↓	↑	→
1-Ethyl-4-methylbenzen	→	→	↑	↑	→	→	↑	↓	→	↓	↑	→
Styren	↑	→	↑	→	→	↓	↑	→	→	↓	↑	→
Cumen	↓	↓	→	n. d.	→	↓	n. d.	n. a.	→	↓	n. d.	n. a.

↑, ↓: signifikanter Trend (einfaktorielle ANOVA mit Signifikanzniveau 0,05), n. d.: nicht detektiert (< LOD), n. a.: nicht auswertbar (Koelution)

Tabelle 15 (Fortsetzung): Vergleich des Einflusses von vier HS-SPME-GC-MS-Probenahme-strategien auf die ermittelten Trends in den VOC-Profilen von drei Lungenadenokarzinom-zellkulturen

	A549				Lu7466				Lu7387			
	<i>in situ</i>	Kultur-flüssigkeit	Gas-phase	Probenahme-röhrchen	<i>in situ</i>	Kultur-flüssigkeit	Gas-phase	Probenahme-röhrchen	<i>in situ</i>	Kultur-flüssigkeit	Gas-phase	Probenahme-röhrchen
Acetophenon	→	→	→	→	→	→	↑	→	↓	↓	→	↓
Propanal	↓	↓	↓	→	→	→	→	→	↓	→	↓	→
n-Butanal	↓	→	↓	→	↓	↑	↓	→	↓	↓	↓	→
n-Pentanal	↓	↓	↓	n. a.	↓	↓	n. d.	n. a.	↓	↓	n. d.	n. a.
n-Hexanal	n. a.	↓	n. d.	↓	n. a.	↓	n. d.	↓	n. a.	↓	n. d.	→
n-Heptanal	→	↓	n. d.	→	↓	n. d.	n. d.	↓	↓	n. d.	n. d.	→
n-Oktanal	n. a.	n. d.	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.	n. d.	→	n. a.	n. d.	n. d.	↓
3-Methylbutanal	↓	↓	↓	↓	n. d.	↓	n. d.	n. d.	n. d.	↓	n. d.	n. d.
2-Methyl-2-propenal	↓	→	↓	↓	↓	↑	n. d.	→	↓	↓	n. d.	→
2-Methyl-2-butenal	↓	↓	↓	n. d.	↓	→	n. d.	n. d.	↓	↓	n. d.	n. d.
Ethanol	→	→	↑	→	→	→	→	→	→	→	→	→
1-Propanol	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
2-Propanol	↑	↑	↑	→	→	→	↑	→	→	→	→	→
1-Butanol	→	n. d.	↑	n. a.	→	→	n. d.	↓	→	→	→	→
2-Methyl-2-propanol	→	→	→	↑	→	↑	→	→	→	→	→	→
2-Ethyl-1-hexanol	→	↓	n. d.	n. a.	→	↑	↑	n. d.	↑	↑	→	n. d.
Cyclohexanol	→	↑	↑	↑	→	↓	↑	→	↑	↑	↑	→
Aceton	↓	→	→	→	→	↑	→	↑	→	↑	→	→
2-Butanon	→	→	↑	→	→	↑	→	→	→	→	→	→
2-Pentanon	→	→	→	↑	→	↑	↑	→	→	↑	↑	→
3-Pentanon	↓	→	→	↑	→	→	→	→	→	→	→	→
2-Hexanon	→	→	→	n. d.	→	↑	n. d.	→	→	→	n. d.	→
3-Hexanon	→	→	↑	n. d.	→	↑	↑	→	→	→	→	→
2-Oktanon	→	→	n. d.	n. a.	→	→	n. d.	n. a.	→	→	n. d.	n. a.
Ethylacetat	↑	↑	↑	→	→	→	↑	→	→	→	→	→
n-Butylacetat	↓	n. d.	n. d.	→	→	n. d.	n. d.	n. a.	↓	n. d.	n. d.	n. a.
Ethylbutyrat	n. d.	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Essigsäure	→	n. d.	↑	→	n. d.	n. d.	↑	→	n. d.	n. d.	↑	→

↑, ↓: signifikanter Trend (einfaktorielle ANOVA mit Signifikanzniveau 0,05), n. d.: nicht detektierbar (< LOD), n. a.: nicht auswertbar (Koelution)

Aus der quantitativen VOC-Analyse mit *in-situ*-SPME-GC-MS waren einige Aldehyde sowie der Alkohol 1-Propanol als potentielle Biomarkerkandidaten identifiziert worden, da der Einfluss aller drei getesteten Lungenkrebszelllinien auf diese Substanzen ähnlich war. Auch bei den anderen betrachteten Probenahmeverfahren wurde durch alle drei Zelllinien eine Erhöhung des 1-Propanolgehaltes festgestellt. Ferner konnte ebenso für alle Probenahmeverfahren – soweit auswertbar – eine Abnahme der Gehalte der Aldehyde *n*-Pentanal, 3-Methylbutanal und 2-Methyl-2-butenal durch die Lungenkrebszellen beobachtet werden. Hingegen war für *n*-Butanal und 2-Methyl-2-propenal für die Teilprobe Kulturflüssigkeit der Zelllinie Lu7466 ein Anstieg durch die Zellen ersichtlich, während für die anderen Probenahmeverfahren und die anderen Zellkulturen eine Reduktion dieser Aldehyde zu erkennen war. Widersprüchliche Trends für den Einfluss von Zellkulturen auf die Aldehydgehalte wurden bisher nur für Acetaldehyd für zwei PEC-Zelllinien beschrieben (Erhöhung: [91, 98, 105], Reduktion: [92, 94]).

Vergleich der Teilprobe Gas und der adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen

Neben der direkten Analyse der Teilprobe Gas zur Ermittlung des VOC-Profiles der Zellkulturen wurden auch adsorbervliesgefüllte Probenahmeröhrchen, beladen mit Zellkulturluft, mittels HS-SPME-GC-MS untersucht. In Abbildung 47 sind die Chromatogramme für die Teilprobe Gas der A549-Zellkultur und für die Zellkulturluft im Probenahmeröhrchen dargestellt, um den Einfluss der Adsorbervliese auf das VOC-Profil zu verdeutlichen. Dabei kann in erster Linie eine Reduktion für die meisten VOC durch die Applikation der Zellkulturluft in das Probenahmeröhrchen beobachtet werden. Die Vliese selber weisen einen relativ hohen VOC-Hintergrund (vgl. Kapitel 3.2.2) auf, so dass im Vergleich zur Gasteilprobe zusätzliche Signale wie Tetrahydrofuran und 1-Methoxy-2-propanal zu beobachten waren. Auch der in der Gasprobe beobachtete Anstieg des Essigsäuregehalts durch die Zellen war in den Probenahmeröhrchen aufgrund der hohen Hintergrundbelastung nicht mehr nachvollziehbar (Tabelle 15).

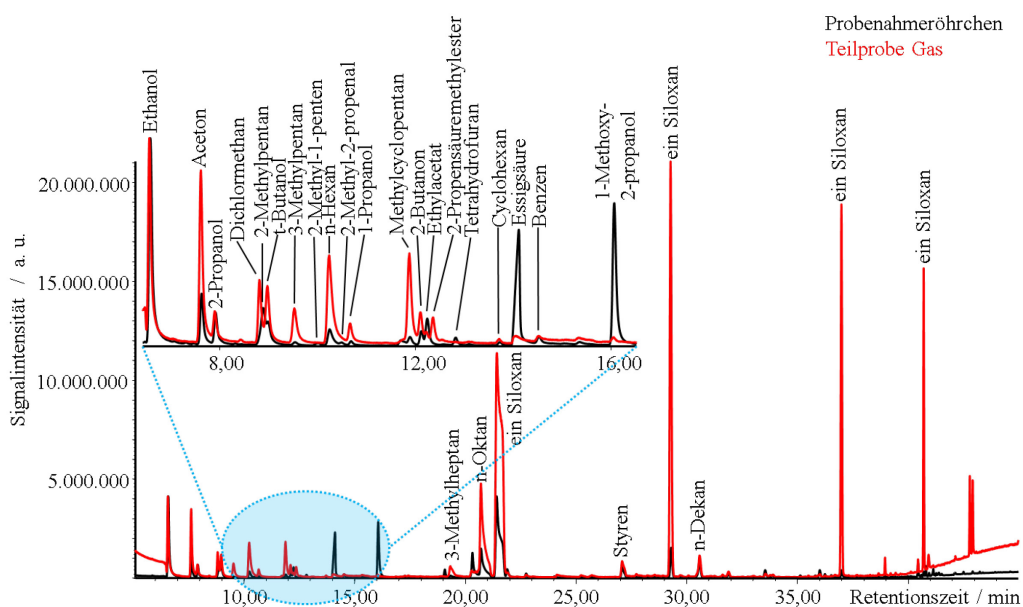


Abbildung 47: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von A549-Zellkulturen, Vergleich von Teilprobe Gas und Luft appliziert in Probenahmeröhrchen

Einige in der Gasteilprobe beobachteten Trends, wie der Anstieg an 1-Propanol für alle drei AC-Zelllinien, waren auch in den adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen ersichtlich (Tabelle 15). Für die A549-Zellkulturen bestätigte sich darüber hinaus die Reduktion von Aldehyden sowie von kurz- und mittelkettigen Alkanen durch die Zellen. Auch die Trends für die Aromaten waren in beiden Probenotypen für die A549-Zelllinie ähnlich. Im Gegensatz dazu konnte für die beiden Zelllinien

Lu7387 und Lu7466 in den Probenahmeröhrchen eine Reduktion des Gehalts einiger Aromaten beobachtet werden, während in der Teilprobe Gas ein Anstieg zu verzeichnen war. Demzufolge ist die Untersuchung der beladenen Probenahmeröhrchen zumindest für die Zellkulturen nur eingeschränkt geeignet, um die Beschaffenheit der Teilprobe Gas zu beschreiben.

Unter Beachtung der Ergebnisse aller Versuche, die mit den *in-vitro*-Lungenadenokarzinomzelllinien durchgeführt worden waren, scheinen sich einige wenige Aldehyde sowie 1-Propanol als potentielle Biomarkerkandidaten zu ergeben. Allerdings ist noch die Eignung dieser Substanzen unter Berücksichtigung der Aussagekraft der durchgeführten Analysen zu bewerten.

4.1.4 Diskussion der abgeleiteten Biomarkerkandidaten

Die quantitative Untersuchung des VOC-Profiles von Lungenkrebszellkulturen im Vergleich mit zellfreien Nährmedien wurde als Strategie ausgewählt, um potentielle Biomarker für die Atemluftanalyse für die Lungenkrebsdiagnose zu identifizieren. Auf diese Weise konnten 1-Propanol sowie n-Pentanal, 3-Methylbutanal und 2-Methyl-2-butanal als eventuelle Kandidaten ermittelt werden.

Der Alkohol 1-Propanol wurde bereits bei der vergleichenden Untersuchung von reseziertem Tumorgewebe mit unauffälligem Gewebe durch Buszewski *et al.* [53] als erhöht festgestellt. Sowohl Buszewski *et al.* [76] als auch Rudnicka *et al.* [133] konnten eine signifikante Erhöhung des 1-Propanolgehalts im Atem von Lungenkrebskranken gegenüber nicht-rauchenden und rauchenden Gesunden beobachten. Ligor *et al.* [67] und Bajtarevic *et al.* [84] schlugen Biomarkersets für Lungenkrebs vor, in denen 1-Propanol enthalten war. Trotz dieser vielversprechenden Hinweise ist es unwahrscheinlich, dass sich dieser Alkohol als Biomarker für die Lungenkrebsdiagnose auf Basis der Analyse von Atemluft etablieren lässt. 1-Propanol ist Bestandteil von alkoholbasierten Desinfektionsmitteln, so dass es in hoher Menge in der Raumluft von Arzthäusern und Kliniken vorhanden ist [125] und als Hintergrundkontamination die Auswertung der Atemgehalte erschweren dürfte.

Für die Aldehyde konnte in dem *in-vitro*-Zellmodell im Wesentlichen eine Reduktion der Gehalte durch die Zellen beobachtet werden. Andererseits wurde bisher für Atemluft von Lungenkrebskranken im Vergleich zu Gesunden eine Zunahme beobachtet [16, 76]. Auch in Blut- [82] und Urinproben [79] von Lungenkrebspatienten wurde für n-Hexanal ein erhöhter Gehalt festgestellt. Folglich werden für die Aldehyde bei Analyse der Zellkulturen andere Ergebnisse erhalten als für Realproben.

Bei Anwendung der *in-situ*-SPME auf die Zellkulturen war für einige Alkane und Aromaten ein Einfluss der A549-Zellen auf das VOC-Profil im Vergleich zu Ansätzen mit zellfreiem Nährmedium beobachtet worden. Basierend auf den Untersuchungen zur VOC-Hintergrundbelastung leerer Einwegzellkulturflaschen (vgl. Kapitel 4.1.1) handelt es sich bei diesen Substanzen sehr wahrscheinlich um Stoffe mit exogener Herkunft. Die Betrachtung solcher Substanzen erscheint nicht ergebnisorientiert zu sein, da sie sich in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Umgebungsbedingungen wahrscheinlich nicht gleich verhalten werden. Auch die zunächst als potentiellen Biomarker abgeleiteten Aldehyde konnten teilweise bereits in der leeren Zellkulturflasche detektiert werden; jedoch konnte für diese Substanzklasse bereits in mehreren unabhängigen Studien eine Metabolisierung durch die Zellen beobachtet werden [97, 99-101, 103].

Zusammengefasst konnten auf Basis der Untersuchungen von Lungenadenokarzinomzellkulturen keine geeigneten Biomarkerkandidaten abgeleitet werden. Eine weiterführende Diskussion zum Vergleich dieses Zellkulturmodells mit Realproben erfolgt in Kapitel 4.3. Im Weiteren erfolgt die Vorstellung der Ergebnisse der quantitativen Untersuchung von Atemluft.

4.2 VOC-Profile von Realproben

Die Gewinnung von Atemluftproben von Lungenkrebspatienten und Gesunden erfolgte in Kooperation mit den zwei Berliner Kliniken Charité und ELK im Rahmen einer Proof-of-Principle-Studie. Das

Vorgehen bei der Probenahme der Atemluftproben mit verschiedenen Probenahmekörpern für die quantitative und qualitative VOC-Analyse ist bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben worden.

Zunächst erfolgt die detaillierte Vorstellung der quantitativen Ergebnisse für die Untersuchung des VOC-Profiles von Atemluftproben in Gassammelrohren. Dabei wird als erstes auf die Screeninguntersuchungen zur Festlegung des Analytspektrums eingegangen (vgl. Kapitel 3.4.2). Danach erfolgt eine Beschreibung des entwickelten Gasmodells, welches Basis für die qualitätsgesicherte Analyse der Atemluftproben war (vgl. Kapitel 3.2.1). Anschließend werden sowohl Eigenuntersuchungen als auch Studiendaten im Hinblick auf einen Blindwerteinfluss und die Auswirkungen des Rauchens auf das VOC-Profil quantitativ ausgewertet (vgl. Kapitel 3.4.3). Die im Weiteren durchgeführte Anwendung uni- und multivariater Verfahren auf die Studiendaten erlaubt die Ableitung potentieller Biomarker für die Lungenkrebserkennung, die von einer ersten Bewertung der Kandidaten begleitet wird. Zuletzt erfolgt die Betrachtung der qualitativen VOC-Analyse weiterer Studienproben – Verlaufspuben (Kapitel 3.4.3), Atemluftproben in Probenahmeröhrchen (Kapitel 3.4.4) und Gewebepuben (Kapitel 3.4.5) – um gegebenenfalls weitere Informationen bzgl. der ermittelten Kandidaten ableiten zu können.

4.2.1 Screeninguntersuchungen von Atemluftproben in Gassammelrohren

Voraussetzung für die Quantifizierung der VOC-Gehalte der Atemluftproben in den Gassammelrohren war eine substanz- und matrixspezifische Kalibrierung. Im Vorfeld musste dafür ein Analytspektrum ausgewählt werden. Dies erfolgte auf Basis der Literaturrecherche (vgl. Kapitel 2.2) und durch Screeninguntersuchungen von Atemluftproben von Lungenkrebspatienten. Die Analyse der Atemluftproben erfolgte unter Anwendung der SPME-Technik mit einer Car/PDMS-Faser (75 µm) für 1 h bei Raumtemperatur und einer sich anschließenden GC-MS-Analyse entsprechend den aus der Methoden- (Kapitel 3.1) und Modellentwicklung (Kapitel 3.2) hervorgegangenen Bedingungen. Ein beispielhaftes HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm für eine solche Atemluftprobe ist in Abbildung 48 dargestellt. Eine tabellarische Übersicht der detektierten Signale aller sechs im Screening untersuchten Atemluftproben findet sich in Anhang Tabelle 34 (Seite A-45).

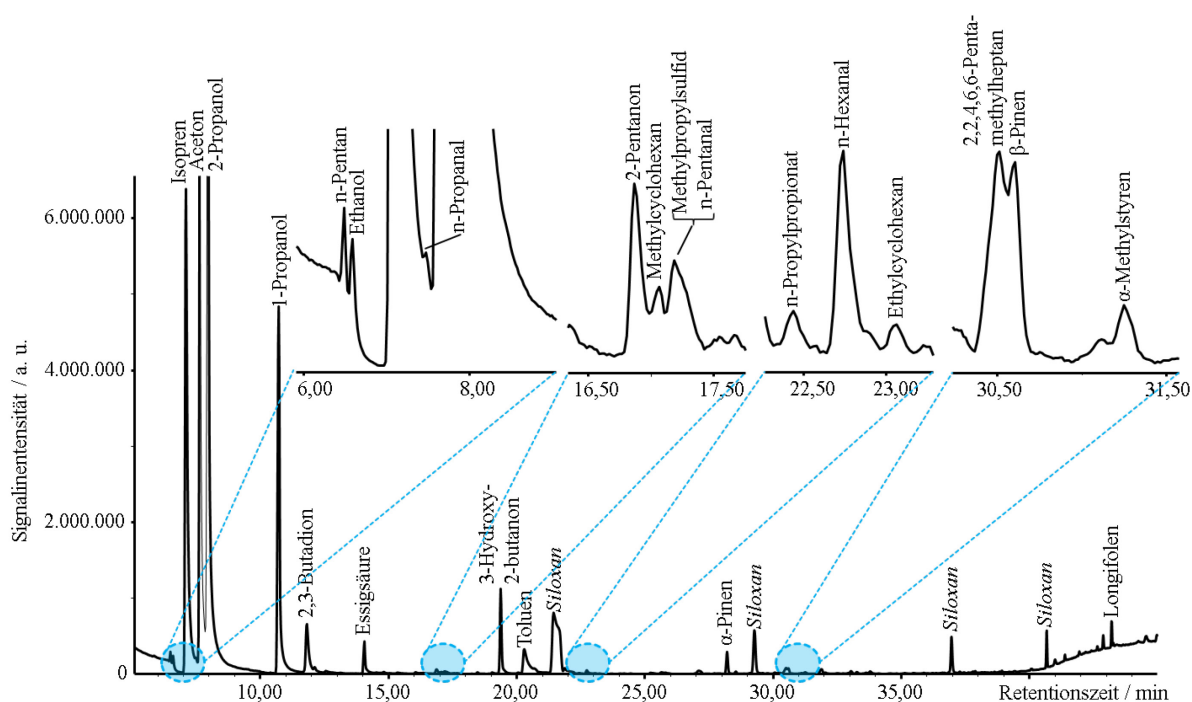


Abbildung 48: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm der Atemluftprobe eines Lungenkrebspatienten im Gassammelrohr; neben den intensitätsstarken Signalen von Isopren, Aceton und dem exogenen 2-Propanol konnten einige in der Literatur als Lungenkrebsmarker postulierte VOC identifiziert werden; detektierte Siloxane stammen aus der SPME-Faser

Die identifizierbaren Substanzen lassen sich den Substanzklassen Alkane, Alkene, Alkohole, Aldehyde, Ketone, Säuren, Ester, Nitrile, schwefelhaltige Verbindungen, Aromaten, Heteroaromaten, halogenhaltige Substanzen und Terpene zuordnen. Aus diesem Spektrum wurden unter Beachtung der Literatur Zielsubstanzen für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

In einschlägiger Literatur (vgl. auch Kapitel 2.2) wurden Alkane mehrfach als Lungenkrebsmarker vorgeschlagen [6, 51, 68, 70] und ebenso Aldehyde [16, 18, 66, 68, 76, 182]. Es wird diskutiert, dass vermehrt auftretender oxidativer Stress zu einem Anstieg der Gehalte an Aldehyden und Alkanen in der Atemluft führt [72, 109, 183-185]. Vor allem aus der Anfangszeit der Atemluftanalytik stammt der Vorschlag der Aromaten als Lungenkrebsmarker [6, 66, 68, 69, 132]; allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass die Studiengruppen im Hinblick auf das Rauchverhalten ungünstig ausbalanciert waren und es sich dabei eher um Marker für das Rauchen handeln dürfte [186, 187]. Die Substanz 1-Butanol wurde ebenso bereits im Zusammenhang mit Lungenkrebs diskutiert [83] und ferner auch die VOC 2-Pentanon und 2-Butanon [76].

Diese Substanz(klass)en konnten auch bei den Screeninguntersuchungen beobachtet werden. Folglich wurden die in Kapitel 3.4.2 benannten VOC als Zielsubstanzen ausgewählt. Auch im Vergleich mit später analysierten Atemluftproben von gesunden Studienteilnehmern ergaben sich keine weiteren offensichtlichen Kandidaten. Für diese Zielsubstanzen konnte nun durch Anwendung eines Gasmodells die Basis für die qualitätsgesicherte, quantitative VOC-Analytik gewährleistet werden.

4.2.2 Gasmodell und qualitätsgesicherte, quantitative Analyse von Atemluftproben

Gasmodell

Die Entwicklung des Gasmodells ist ausführlich in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Als Probenahmekörper für die quantitative VOC-Analyse in Atemluft wurde ein Gassammelrohr aus Glas mit einem Volumen von 1 L ausgewählt. Als Modellgas kam feuchte synthetische Luft zur Anwendung, um die Atemfeuchtigkeit zu simulieren. Die Einbringung von VOC erfolgte in Form eines methanolischen Standardgemisches. Weil die Proben mit SPME analysiert werden sollten und diese Probenahme-technik stark matrixbeeinflusst ist, wurden zusätzlich zu den 24 Zielsubstanzen drei Matrixsubstanzen in den Standard integriert. Dieses Gasmodell wurde nun für die Kalibrierung der HS-SPME-GC-MS-Methode eingesetzt.

Kalibrierung

Die zielgerichtete Analyse erfolgte für 24 Zielsubstanzen unter Einbeziehung von drei Matrixverbindungen. Das HS-SPME-GC-MS-Verfahren wurde für diese Substanzen kalibriert. Die zunächst angewandte lineare Auswertung wurde durch eine quadratische Regression für einen erhöhten Kalibrierbereich ersetzt (Anhang Abbildung 15, Seite A-53). Zur Erhöhung der Empfindlichkeit erfolgte die Detektion der Zielsubstanzen im SIM-Modus.

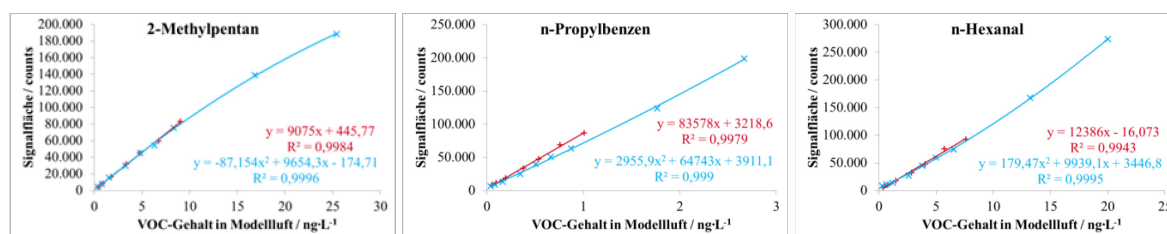


Abbildung 49: Vergleich zweier Kalibrierbereiche 1:20 (rot) und 1:70 (blau) für die VOC-Analytik mit HS-SPME-GC-MS in Atemluftproben in Gassammelrohren für 2-Methylpentan, n-Propylbenzen und n-Hexanal

Es ist deutlich zu erkennen, dass aufgrund der Erweiterung des Kalibrierbereiches der lineare Arbeitsbereich für die meisten VOC verlassen wurde (Abbildung 49); es ergab sich substanzspezifisch entweder eine konvexe oder eine konkave Funktion. Es ist wahrscheinlich, dass bei den konkaven Funktionen bei hohen Standardkonzentrationen eine beginnende Sättigung der SPME-Faser auftrat. Dem-

gegenüber bedeutet eine konvexe Form, dass mit zunehmendem Gehalt eine Erhöhung der Extraktionseffizienz einherging. Gegebenenfalls bildete sich aufgrund der allgemein hohen Beladung ein organischer Lösungsmittelfilm auf der SPME-Faser aus, der eine zusätzliche Extraktion dieser Substanzen begünstigte.

Aus der Anwendung einer quadratischen Regression resultierte, dass die Methode für die verschiedenen Konzentrationsbereiche unterschiedlich empfindlich war. Ferner folgte aus der quadratischen Funktion bzw. aus dem Scheitelpunkt, dass der Wertebereich nicht mehr alle möglichen y-Werte (Signalflächen) erfasste. Dadurch konnte es vorkommen, dass bei einem sehr niedrigen oder sehr großen Analysenwert, der deutlich außerhalb des Kalibrierbereiches lag, mittels der quadratischen Regressionsfunktion keine zugehörige Konzentration mehr ausgegeben werden konnte; durch die Analysenfunktion wurde kein Konzentrationswert erhalten. Prinzipiell ist die Anwendung einer Kalibrierfunktion zwar nur bis maximal 10 % unter dem niedrigsten und über dem höchsten Kalibrierpunkt zulässig, aber sie kann für weiter abweichende Messwerte zumindest als Abschätzung herangezogen werden. Diese Option zur Abschätzung entfällt bei einer quadratischen Regressionsfunktion für Extremwerte. Diese Einschränkungen, die durch Anwendung einer quadratischen Regressionsfunktion bedingt waren, wurden hingenommen, um auch noch Atemluftproben mit höheren und nicht vom linearen Kalibrierbereich erfassten VOC-Gehalten auswerten zu können.

Quantifizierung auf Basis von Qualitätskontrollstandardanalysen

Für die Durchführung einer Kalibrierung mit neun Niveaus wurden unter Beachtung der Vorbereitungszeit mehr als zehn Stunden Arbeitszeit benötigt. Für jede Atemluft- und Blindwertprobe käme eine zusätzliche Stunde dazu. Damit war eine tagesaktuelle Kalibrierung zur Auswertung der VOC-Gehalte in Atemluftproben nicht praxistauglich. Andererseits verhinderte die mit zunehmendem Fasergebrauch sich verändernde Extraktionseffizienz der SPME-Faser (Abbildung 18, Seite 33) die wiederholte Anwendung einer einmalig erstellten Kalibrierung während der Lebensdauer der Faser von ca. 100 Analysen zur Ermittlung korrekter VOC-Gehalte.

Die einfachste Möglichkeit, quantitative Analytik unter Anwendung der SPME-Technik durchzuführen, basiert auf dem Einsatz von internen, idealerweise isotoopenmarkierten Standards [131]. Die Einbringung eines lösungsmittelhaltigen Standards in eine gasförmige Probe würde zu einer deutlichen Signalreduktion im Analysenchromatogramm der Probe führen, was bereits bei der Untersuchung der Teilprobe Gas aus Zellkulturen festgestellt worden war (vgl. Kapitel 4.1.3 und Anhang Abbildung 11, Seite A-41). Andererseits hätte die Einbringung eines gasförmigen internen Standards in dem Gassammelrohr zu einem Überdruck geführt, der gegebenenfalls Undichtigkeiten nach sich gezogen hätte. Beide Varianten beinhalteten ein Kontaminationsrisiko, weswegen keine Einbringung eines internen Standards als Basis für die Quantifizierung erfolgte.

Anstelle dessen wurden tagesaktuell zu den Atemluft- und Blindwertproben Qualitätskontrollanalysen anhand des Gasmodells mit Standardlösungen in drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Mit den erhaltenen Signalintensitäten konnte für diese drei Konzentrationslevel wiederum eine quadratische Regressionsfunktion ermittelt werden, auf deren Basis die Quantifizierung der VOC-Gehalte in den taggleich analysierten Proben erfolgte. Folglich diente die Kalibrierung über neun Niveaus nicht der Quantifizierung; stattdessen wurde damit geprüft, ob die Anwendung der quadratischen Kalibrierfunktion für den gewählten Arbeitsbereich zulässig war.

Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode für die verschiedenen VOC wurden durch Analyse des Gasmodells mit Standardlösungen niedriger Konzentration in einem linearen Arbeitsbereich (vgl. Kapitel 3.2.1) und durch Anwendung der Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645 ermittelt. Zusätzlich zu den erhobenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 16 Nachweisgrenzen von bereits publizierten Methoden anderer Arbeitsgruppen zum Vergleich

angegeben. Die Umrechnung von Atemgehalten in verschiedene Einheiten ist in den Formeln (11) und (12) (Seite A-58) dargelegt; eine Gegenüberstellung für die Zielsubstanzen für die Einheiten $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, ppb_V , und $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ist in Anhang Tabelle 40 (Seite A-59) aufgeführt.

Im Vergleich der experimentell ermittelten Nachweisgrenzen für die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Methode mit Literaturdaten ist ersichtlich, dass diese in einer ähnlichen Größenordnung liegen. Zum Beispiel ergibt sich in Relation zur Methode von Fuchs *et al.* [16], die spezifisch zur Aldehydbestimmung in Atemluft mit HS-SPME-GC-MS nach On-Fibre-Derivatisierung eingesetzt wurde, für Propanal und n-Pentanal eine höhere (schlechtere) Nachweisgrenze, für n-Butanal und n-Hexanal vergleichbare Werte und für die restlichen Aldehyde zwei- bis zehnfach niedrigere Nachweisgrenzen. Eine mögliche Ursache für die erhöhte Sensitivität der hier dargelegten Methode für die langkettigen Aldehyde könnte in der Anwendung einer deutlich erhöhten Extraktionszeit von 60 min gegenüber den in der Publikation beschriebenen 8 min sein. Bei Ulanowska *et al.* [18] wurden für verschiedene betrachtete Analyten höhere Nachweisgrenzen angegeben. Im Vergleich der hier beschriebenen Methode mit der von Yu *et al.* [69] vorgestellten SPME-GC-Flammenionisationsdetektion-Methode ergaben sich deutlich bessere Nachweisgrenzen für die Aromaten Benzen und n-Propylbenzen.

Tabelle 16: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) von 24 Ziel-VOC bei Bestimmung mit HS-SPME-GC-MS in Gassammelrohren mit standarddotierter, angefeuchteter Modellluft im Vergleich mit Nachweisgrenzen* von publizierten Methoden anderer Arbeitsgruppen

Substanz	eigene Daten		LOD für in der Literatur beschriebene HS-SPME-GC-Methoden				
	LOD /	LOQ /	Fuchs <i>et al.</i>	Kischkel <i>et al.</i>	Ulanowska <i>et al.</i>	Buszewski <i>et al.</i>	Yu <i>et al.</i> [69]
	$\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	[16] $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	[78] $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	[18] $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppb)	[76] $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppb)	[69] $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
n-Pentan	0,139	0,509		8,59 (0,119)	2,36 (0,8)	1,45 (0,49)	
n-Hexan	0,171	0,582		2,50 (0,029)	2,82 (0,8)	1,69 (0,48)	
n-Heptan	0,088	0,290		3,51 (0,035)	3,28 (0,8)		
n-Oktan	0,109	0,373					
n-Nonan	0,156	0,536					
n-Dodekan	0,258	0,830					
2-Methylpentan	0,138	0,487		6,81 (0,079)	1,06 (0,3)	1,09 (0,31)	
3-Methylpentan	0,083	0,288		4,05 (0,047)	1,06 (0,3)	1,13 (0,32)	
Methylcyclopentan	0,061	0,208			0,69 (0,2)		
Cyclohexan	0,071	0,242		15,1 (0,179)			
Benzen	0,208	0,705		2,27 (0,029)	0,96 (0,3)	1,37 (0,43)	250 (0,25)
Ethylbenzen	0,067	0,231			1,30 (0,3)	1,39 (0,32)	
n-Propylbenzen	0,011	0,039					67 (0,067)
Propanal	1,2	4,2	0,35 (0,006)	5,46 (0,094)	4,51 (1,9)	1,23 (0,52)	
n-Butanal	0,217	0,722	0,29 (0,004)	3,03 (0,042)		1,30 (0,44)	
n-Pentanal	0,181	0,616	0,09 (0,001)	10,4 (0,121)	3,52 (1,0)		
n-Hexanal	0,138	0,478	1,00 (0,010)	8,31 (0,083)	2,05 (0,5)		
n-Heptanal	0,148	0,511	0,34 (0,003)	3,31 (0,029)			
n-Oktanal	0,216	0,724	1,15 (0,009)	12,7 (0,099)			
n-Nonanal	0,344	1,098	3,98 (0,028)				
n-Dekanal	0,512	1,588	8,13 (0,052)				
1-Butanol	0,246	0,824					
2-Butanon	0,830	2,883		3,10 (0,043)	2,06 (0,7)	1,33 (0,45)	
2-Pentanon	0,517	1,807			2,11 (0,6)	1,55 (0,44)	

*: Originaldaten sind in Klammern vermerkt, Umrechnung in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ entsprechend Formeln (11) und (12) (Seite A-58)

Die Bestimmung weiterer Validierungsparameter, wie z. B. Wiederfindung oder Wiederholbarkeit, war nicht möglich, da dies die mehrfache Analyse einer Probe mit bekanntem Gehalt voraussetzt. Für

die Analyse von VOC in Atemluft existierte jedoch kein Referenzmaterial (vgl. Kapitel 2.3.2). Auch die mehrfache Untersuchung einer selbst erzeugten Atemluftprobe war aufgrund der Anwendung der SPME direkt in dem Gassammelrohr nicht zielführend, da die SPME bei den gewählten Extraktionsbedingungen (60 min) zu einer signifikanten Abreicherung der Analyten in der Probe führte.

Untersuchung des Einflusses der Probenlagerungszeit auf das analysierte VOC-Profil

Aufgrund der Organisation ergaben sich Probenstandzeiten von bis zu drei Tagen zwischen Atemluftprobenahme und instrumenteller Analyse (vgl. Kapitel 3.4.3). Deswegen wurde der Einfluss einer Probenlagerung von bis zu 4 Tagen für die 24 Zielsubstanzen untersucht (vgl. Kapitel 3.2.1). In Abbildung 50 sind die Wiederfindungen für die Zielsubstanzen bei einer Lagerung von bis zu vier Tagen dargestellt. Die Lagerung wirkte sich demnach kaum auf die Wiederfindung der Alkane aus. Demgegenüber führt die Lagerung für Aromaten, Aldehyde, Ketone und 1-Butanol zu Verlusten. Eine starke Abnahme der Wiederfindung um ca. 20 % bei einer Standzeit von nur einem Tag war für 1-Butanol, Propanal, n-Nonanal und n-Dekanal zu beobachten. Da die Probenstandzeiten organisatorisch bedingt nicht verringert werden konnten, war auch dieser Lagereinfluss nicht zu verhindern.

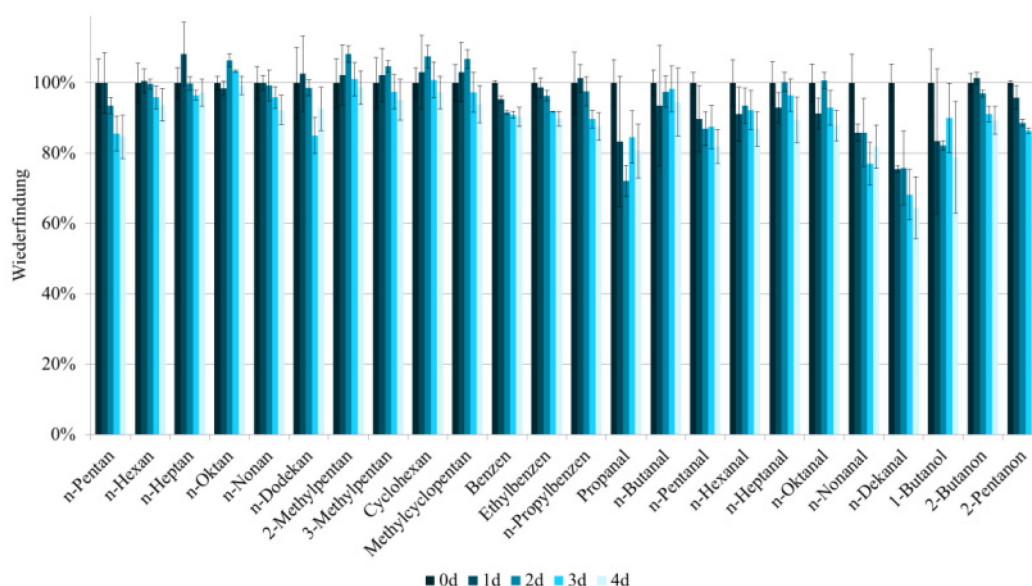


Abbildung 50: Einfluss der Lagerung von Gassammelrohren mit angefeuchteter, standarddotierter Modellluft über vier Tage auf die Wiederfindung von 24 Zielsubstanzen (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Nachdem wichtige Kenndaten für die eingesetzte HS-SPME-GC-MS-Analytik von 24 Ziel-VOC ermittelt waren, konnte diese Methode zur quantitativen Untersuchung des VOC-Profiles von Atemluftproben der Studienteilnehmer eingesetzt werden. Vor der Auswertung der Daten erfolgen als nächstes die Charakterisierung der Studienpopulation und eine erste Datenvorbehandlung.

4.2.3 Beschreibung der Studienpopulation und allgemeine Datenvorbehandlung

Studienpopulation

In dem Studienzeitraum von 14 Monaten konnten zusätzlich zu den Screeningproben 56 Atemluftproben von Patienten und 23 Atemluftproben von Gesunden genommen werden. Es folgte der Ausschluss einiger Proben, die nicht den ursprünglichen Einschlusskriterien entsprachen: Vier Atemluftproben von Lungenkrebspatienten wurden aussortiert, weil das monitorierte Atemvolumen bei Beatmung der Probenahmeröhrchen geringer als das zum Füllen des Gassammelrohr benötigte Volumen von 1,5 L war. 14 Atemluftproben konnten nicht weiter berücksichtigt werden, da sich der anfängliche Verdacht auf Lungenkrebs nicht bestätigte oder weitere maligne Erkrankungen festgestellt wurden. Eine Patientenprobe wurde aus der Betrachtung ausgeschlossen, da die zeitnah durchgeführten Qualitätskontrollanalysen nicht zufriedenstellend waren.

Insgesamt standen 37 Patientenproben und 23 Atemluftproben gesunder Studienteilnehmer zur Verfügung. Damit ist eine ähnliche Probenanzahl wie in anderen Studien erreicht worden: Buszewski *et al.* [76] schlossen 73 Probanden ein und Poli *et al.* [77] untersuchten 68 Atemluftproben, während in der Studie von Fuchs *et al.* [16] nur 36 Teilnehmer angegeben wurden.

Die Studienpopulation ist in Tabelle 17 beschrieben. Das Ziel, gesunde Studienteilnehmer mit einer den Patienten ähnlichen Altersverteilung einzuschließen, wurde erreicht. Dieses ist in bereits veröffentlichten Studien zur Atemluftanalyse von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden häufig nicht der Fall [16, 67, 77, 78, 85, 133], obwohl damit der Problematik der kontroversen Diskussion eines Einfluss des Alters auf die Zusammensetzung der Atemluft (Einfluss: [188], kein Einfluss: [13, 189, 190]) begegnet werden kann. Allerdings sind deutliche Zusammensetzungsunterschiede der beiden Gruppen im Hinblick auf das Geschlecht und das Rauchverhalten auszumachen. Für den Faktor Geschlecht gibt es widersprüchliche Aussagen bezüglich eines Einflusses auf die Atemluftzusammensetzung (Einfluss: [78], kein Einfluss: [13, 190]). Rauchen ist als Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs bekannt [27] und ein Einfluss auf das analysierte VOC-Profil von Atemluft liegt vor (Kapitel 4.2.5). Detaillierte Angaben zur in die Auswertung einbezogenen Studienpopulation finden sich in Anhang Tabelle 38 (Seite A-55).

Tabelle 17: Charakterisierung der Studienpopulation

	Lungenkrebskranke	Gesunde
Probenanzahl	37	23
mittleres Alter (Spanne)	65,9 (52-81)	61,4 (51-78)
Anteil Frauen	35 %	57 %
Anteil aktive Raucher	57 %	17 %

Datenvorbehandlung

Die Prozessierung der Daten erfolgte mit der Software OriginPro 2015. Ein Ausschnitt einer entsprechenden Datenmatrix ist in Abbildung 51 gezeigt.

C(Y)	G(Y)	H(Y)	O(Y)	U(Y)	Y(Y)	AB(Y)	AG(Y)	M(Y)	N(Y)	S(Y)	Q(Y)	
Typ	Rauchverhalten	n-Pentan ng/L	n-Hexan ng/L	n-Heptan ng/L	n-Oktan ng/L	n-Nonan ng/L	n-Dodekan ng/L	2-Methylpentan ng/L	3-Methylpentan ng/L	Cyclohexan ng/L	Methylcyclopentan ng/L	
k	R	5,083	0,582	0,691	0,769	1,260	1,380	0,789	0,305	0,780	0,422	
k	NR	3,472	0,491	0,374	0,539	0,917	1,073	0,496	0,238	0,652	n. a.	n.
k	R	3,882	0,785	0,968	0,767	0,824	1,105	0,949	0,383	1,066	n. a.	
k	NR	49,26	0,473	0,559	0,975	n. d.	1,615	0,587	0,223	0,438	n. a.	n.
k	R	10,84	1,841	1,264	1,161	n. a.	2,211	1,646	0,636	0,934	1,234	
k	R	13,41	2,747	1,179	0,902	n. a.	1,386	5,848	3,398	2,991	3,813	
k	R	9,676	2,464	3,912	0,777	n. a.	0,672	0,928	n. d.	1,523	0,650	
k	R	8,158	2,197	1,680	1,241	n. a.	2,390	2,063	0,944	1,147	n. a.	
k	NR	6,226	0,744	0,705	0,921	1,456	1,853	2,162	0,978	1,961	0,885	
k	R	28,23	1,280	0,953	0,586	n. a.	1,329	3,374	1,590	2,215	1,634	
k	R	13,55	3,425	2,382	2,283	n. a.	1,818	3,949	1,808	2,118	2,812	
k	NR	4,481	0,462	0,963	1,188	2,257	2,581	1,023	0,550	2,488	0,722	
k	NR	7,689	1,361	1,222	0,337	0,405	4,958	5,233	1,954	7,058	1,659	
k	NR	7,167	1,979	0,932	0,314	0,200	0,783	4,899	2,521	2,074	2,389	
k	NR	4,898	0,778	0,403	0,342	0,237	0,762	1,080	0,597	1,212	0,560	
k	R	5,148	0,647	0,830	2,143	4,060	6,378	2,036	0,720	1,771	0,619	
k	R	43,86	2,457	1,954	1,945	3,433	5,502	3,039	1,385	2,589	1,995	
k	R	6,762	0,988	0,928	0,938	1,681	4,849	1,685	0,788	1,468	0,881	
k	NR	3,267	0,411	0,519	0,743	1,648	4,552	0,875	0,371	1,709	0,415	

Abbildung 51: Ausschnitt aus der Datenmatrix mit den Studiendaten für die statistische Auswertung; für die Zielsubstanz n-Nonan ist eine hohe Anzahl an Fehlzeiten ersichtlich; k: krank, NR: Nichtraucher, R: aktiver Raucher, n. a.: nicht auswertbar (Koelution), n. d.: nicht detektierbar

Nachdem die für die Auswertung einzusetzende Anzahl der Proben feststand, wurden die Analyten auf ihre Eignung zum Einbezug in die statistische Analyse betrachtet. Für drei Zielsubstanzen – n-Nonan, Methylcyclopentan und n-Heptanal – waren die Signale bei 10, 14 bzw. 18 Atemluftproben aufgrund von Koelution mit Matrixsubstanzen nicht auswertbar (Anhang Tabelle 39, Seite A-56). Diese VOC wurden als ungeeignet eingestuft und nicht weiter für die statistische Auswertung berücksichtigt. Dieses Vorgehen beruhte auf zwei Überlegungen: Erstens stellt ein aufgrund von Koelution nicht

integrierbares Signal einen Fehlwert ohne Informationsgehalt dar. Die Einführung eines Stellvertreterwertes führt damit aufgrund der hohen Anzahl zu einer unbeabsichtigten Zentrierung des Datensatzes. Zweitens eignet sich eine Substanz, für die in mehr als 15 % aller Proben keine Quantifizierung vorgenommen werden kann, sehr wahrscheinlich nicht als potentieller Biomarker.

Anhand der für manche Analyten hohen Anzahl von Fehlwerten lassen sich zusätzliche Aussagen über die Eignung der entwickelten HS-SPME-GC-MS-Methode für die Atemluftanalytik ableiten. Atemluft erscheint zunächst eine unkomplizierte Matrix zu sein; allerdings kommt es aufgrund der hohen Anzahl von Analyten im Spurenbereich kombiniert mit dem Fehlen spezifischer Fragmente der niedermolekularen VOC zu Problemen bei der Auswertung – die Spezifität ist eingeschränkt. Für einige Analyten (Benzen, langkettige Aldehyde) sind die Gehalte bei mehr als 15 % der Studienteilnehmer unterhalb der Nachweisgrenze, während vor allem für Cyclohexan 20 % der Werte über dem Arbeitsbereich liegen und davon neun nicht mit der quadratischen Regressionskurve kalkuliert werden konnten. Und auch für Benzen liegen noch sechs Werte über dem höchsten Konzentrationsniveau der Kalibrierung. Obwohl die Anwendung eines Arbeitsbereiches erfolgte, der vom niedrigsten zum höchsten Kalibrierpunkt ein Konzentrationsverhältnis von 1:70 aufweist, konnten in der Atemluft wegen der großen Spannweite der VOC-Gehalte noch relativ häufig Werte festgestellt werden, die von diesem Konzentrationsbereich nicht erfasst waren. Dabei wurde auch ein Nachteil der gewählten SPME-Methodik deutlich: Proben mit VOC-Gehalten oberhalb des Arbeitsbereiches können nicht verdünnt werden. Eine Wiederholungsanalyse mit verkürzter SPME-Extraktionszeit würde eine separate Kalibrierung voraussetzen. Darüber hinaus war eine Wiederholungsanalyse ausgeschlossen, da je Studienteilnehmer nur eine Atemluftprobe im Gassammelrohr zur Verfügung stand.

Insgesamt können also mit der entwickelten HS-SPME-GC-MS-Methode mehrere VOC parallel in Atemluftproben analysiert werden. Dagegen ist vor allem der hohe Zeit- und Qualitätskontrollaufwand in Kombination mit den eingeschränkten Wiederholungsmöglichkeiten als Nachteil anzusehen.

Für die Auswertung der 21 übrigen Zielsubstanzen (Ausschluss von Methylcyclopentan, n-Nonan und n-Heptanal) wurden die vorhandenen Fehlzeiten durch Stellvertreterwerte ersetzt. Die Stellvertreterwerte wurden dabei wie folgt ausgewählt:

- Daten, die aufgrund von Koelutionen nicht auswertbar waren, wurden dem Median des Analyten für alle Atemluftproben gleichgesetzt; dadurch blieb der ursprüngliche Median für diese Substanz unverändert.
- Nicht nachweisbare Analyten wurden durch Werte in Höhe der halben Nachweisgrenze ersetzt.
- Substanzen mit sehr hohen Signalintensitäten, für die aufgrund der quadratischen Regression kein Gehalt berechnet werden konnte, wurden mit 120 % der Konzentration des am höchsten konzentrierten Standards des Arbeitsbereiches belegt.

Die Anzahl der Fehlzeiten für jede Substanz sowie die einzelnen Stellvertreterwerte sind im Anhang Tabelle 39 (Seite A-56) angegeben.

Dieser vorbereitete Studiendatensatz wurde für die Auswertung der in Atemluft analysierten VOC-Gehalte im Hinblick auf das Rauchverhalten (Kapitel 4.2.5) und den Gesundheitszustand (Kapitel 4.2.6) eingesetzt. Für die im folgenden Kapitel dargestellte Blindwertproblematik wurde davon abgewichen, da das eingesetzte statistische Verfahren eine vereinfachte Datenvorbehandlung erlaubte. Dieser Auswertung des Studiendatensatzes werden jedoch zunächst die Eigenuntersuchungen zum Blindwerteinfluss vorangestellt.

4.2.4 Einfluss des Blindwerts

Eigenuntersuchungen zur Hintergrundproblematik

In Atemluftproben aus den Kliniken war im Vergleich zu Atemluftproben aus der BAM ein dominierendes Signal von 2-Propanol beobachtet worden. Es ist bekannt, dass 2-Propanol als verbreiteter Bestandteil in Desinfektionsmitteln ubiquitär in der Klinikumgebung in hohen Konzentrationen vorhanden ist und sich somit auf die Atemluftzusammensetzung der Personen vor Ort auswirken kann [125]. Damit stellte sich die Frage, welche der Ziel-VOC im Atem durch die Umgebungsluft beeinflusst wurden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst zwei Eigenversuche A und B mit je drei Gesunden B, J und S durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.3).

In Abbildung 52 sind für Versuchsdurchführung A beispielhaft für 2-Butanon und Cyclohexan die Gehalte in der Atemluft und der Umgebung über einen Zeitraum von 120 min aufgetragen. Für 2-Butanon ist für die Probanden J und S zu erkennen, dass trotz deutlicher Änderung der Hintergrundgehalte nahezu keine Änderung des Gehaltes in der Atemluft zu beobachten war. Demgegenüber scheint für Cyclohexan ein Einfluss der Hintergrundgehalte auf die Atemluft zu bestehen; bei Proband B ist in beiden Durchführungen ein vergleichbarer Verlauf der Hintergrund- und Atemgehalte über die Zeit zu erkennen. Proband S wies zu Beginn des Versuches einen hohen Cyclohexangehalt in der Atemluft auf, der deutlich über dem Gehalt in der Raumluft lag. Nach 30 min war dieser Wert in der Atemluft unter das Niveau der Raumluft gesunken und nach weiteren 90 min konnten etwas erhöhte Gehalte analog zu dem Gehalt in der Umgebung beobachtet werden. Die Ergebnisse für weitere Zielsubstanzen sind in Anhang Abbildung 12 (Seite A-47) dargestellt. Soweit auswertbar, scheint vorwiegend für die Alkane ein Einfluss der Umgebungsluft auf die Atemluftzusammensetzung zu bestehen.

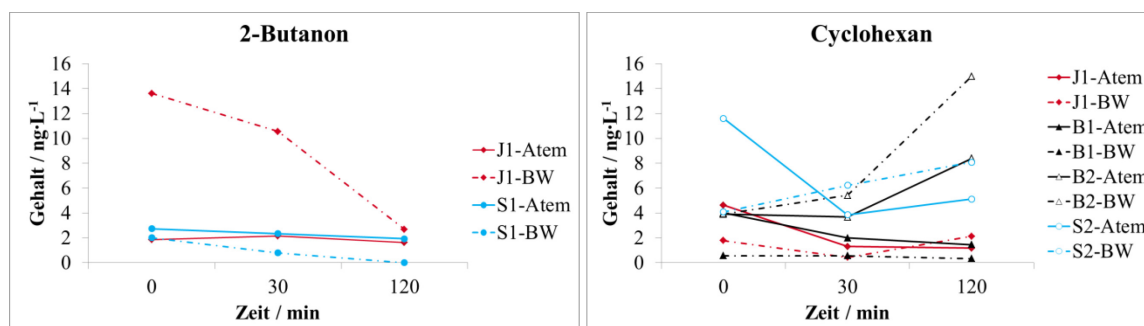


Abbildung 52: Ausgewählte Eigenuntersuchungen (Durchführung A) zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf die Gehalte von 2-Butanon und Cyclohexan in der Atemluft (Atem) für verschiedene Probanden (B, J, S) analysiert mit HS-SPME-GC-MS

In Versuchsdurchführung B wurde getestet, ob sich ein verändernder Hintergrund auf die Gehalte im Atem auswirkt. In Abbildung 53 sind beispielhaft für 1-Butanol und 2-Methylpentan die Gehalte in der Atemluft und der verschiedenen Umgebungen aufgetragen. Für den Alkohol konnten in der Raumluft deutlich höhere Gehalte beobachtet werden als im Freien; trotzdem führt ein dreißigminütiger Aufenthalt in diesem Raum zu keiner relevanten Erhöhung der 1-Butanolgehalte im Atem. Demgegenüber wurde für 2-Methylpentan eine starke Korrelation der Atemgehalte mit den Umgebungsgehalten beobachtet. Die Ergebnisse für weitere Zielsubstanzen sind in Anhang Abbildung 13 (Seite A-48) dargestellt. Analog zur Versuchsdurchführung A erscheinen vorwiegend die Gehalte der unpolaren Substanzen in der Atemprobe akut durch die Zusammensetzung der Einatemluft beeinflusst worden zu sein.

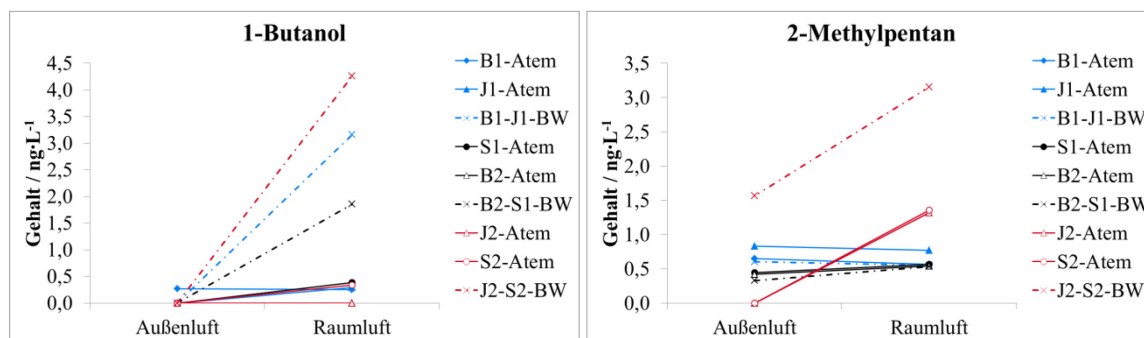


Abbildung 53: Ausgewählte Eigenuntersuchungen (Durchführung B) zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf die Gehalte von 1-Butanol und 2-Methylpentan in der Atemluft (Atem) für verschiedene Probanden (B, J, S) analysiert mit HS-SPME-GC-MS; je eine Blindwertprobe steht im Zusammenhang mit zwei Atemluftproben verschiedener Probanden

Zusammenfassend ließ sich ein Einfluss der Hintergrundbelastung auf die Gehalte im Atem für zumindest einige, vor allem unpolare Substanzen belegen. Für die kurzkettigen Alkane scheint es einen recht starken Hintergrundeinfluss zu geben. Für polare Substanzen, wie 1-Butanol und 2-Butanon, erfolgt keine relevante Beeinflussung der Gehalte in der Atemluft durch die Umgebung. Für Propanal ergaben sich in den beiden Versuchsdurchführungen widersprüchliche Ergebnisse und für die anderen Aldehyde war die Zahl auswertbarer Proben zu gering, um Aussagen ableiten zu können.

Als nächstes sollte anhand der Studiendaten geprüft werden, ob sich die aus diesen Eigenversuchen abgeleiteten Aussagen bestätigen ließen.

Auswertung der Studiendaten im Hinblick auf einen Blindwerteeinfluss

In der ELK und der BAM wurde zusätzlich zur Atemluft auch die Raumluft des Probenahmebereichs beprobt. Im Anhang Abbildung 16 (Seite A-56) sind beispielhaft je ein HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm von Hintergrundproben beider Standorte dargestellt. Insgesamt standen für 37 Atemluftproben von Gesunden und Kranken 14 Blindwertproben für einen Vergleich zur Verfügung.

Als Arbeitshypothese wurde eine Beeinflussung der VOC-Gehalte in der Atemluft durch die Blindwertgehalte angenommen (Anhang Abbildung 17, Seite A-57). Im Gegensatz zur Beschreibung in der allgemeinen Datenvorbehandlung (Kapitel 4.2.3) wurde für diese nachfolgende Auswertung zur Beurteilung des Blindwerteeinflusses eine abweichende Datenbehandlung durchgeführt: Für Gehalte unter der Nachweisgrenze wurde für die Berechnung der Wert Null eingesetzt. Nicht quantifizierbare Signale (durch Koelution oder Überschreitung des erfassbaren Wertebereiches) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Zur Prüfung eines Zusammenhanges wurden die Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r nach Formel (1) ermittelt [191]:

$$r = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

r : Pearson'scher Korrelationskoeffizient

n : Anzahl der Messwertpaare

x_i : i -ter Messwert der Messwertreihe x (VOC-Gehalt in Blindwert)

\bar{x} : Mittelwert der Messwertreihe x (mittlerer VOC-Gehalt im Blindwert)

y_i : i -ter Messwert der Messwertreihe y (VOC-Gehalt in Atemluft)

\bar{y} : Mittelwert der Messwertreihe y (mittlerer VOC-Gehalt in Atemluft)

Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r ist ein Gütekriterium für den Grad des linearen Zusammenhanges zweier Datensätze. Ein statistischer Signifikanztest gibt bei einer ausreichend hohen Anzahl an Wertepaaren häufig auch für schwach-korrelierte Datenpaare einen signifikanten Zusammenhang wieder. Deswegen wurde als pragmatischer Ansatz von einem Hinweis für einen linearen Zusam-

menhang zwischen den Gehalten in den Blindwertproben und in der Atemluft ausgegangen, wenn der Pearson'sche Korrelationskoeffizienten mehr als 0,5 betrug.

Tabelle 18: Pearson'sche Korrelationskoeffizienten r für den Zusammenhang zwischen dem VOC-Gehalt in der Atemluft und in der Umgebungsluft in den Studiendaten; $r > 0,5$ lässt auf einen Hintergrundeinfluss auf die Zielsubstanz schließen

Substanz	r	Substanz	r	Substanz	r
n-Pentan	0,72	Methylcyclopentan	0,48	n-Hexanal	0,01
n-Hexan	0,30	Cyclohexan	0,74	n-Heptanal	0,35
n-Heptan	0,45	Benzen	0,43	n-Oktanal	0,18
n-Oktan	0,38	Ethylbenzen	0,20	n-Nonanal	0,16
n-Nonan	0,70	n-Propylbenzen	0,72	n-Dekanal	0,25
n-Dodekan	0,85	Propanal	0,81	1-Butanol	0,24
2-Methylpentan	0,68	n-Butanal	0,46	2-Butanon	0,39
3-Methylpentan	0,61	n-Pentanal	0,04	2-Pentanon	0,50

Für die Alkane, mit Ausnahme von n-Hexan, n-Heptan, n-Oktan und Methylcyclopentan, sowie für n-Propylbenzen und Propanal war ein Einfluss der Umgebungsluft auf die Atemgehalte festzustellen (Tabelle 18); demgegenüber ließ sich für die anderen Aldehyde, die Ketone und 1-Butanol kein Einfluss der Blindwerte auf den Atem ermitteln. Für die Alkane war bereits auf Basis der Eigenversuche ein Hintergrundeinfluss abgeleitet worden.

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit Darstellungen von Španěl *et al.* [158], welcher zur Abschätzung des Hintergrundeinflusses Retentionskoeffizienten für sieben Substanzen experimentell ermittelte. VOC mit Retentionskoeffizienten nahe Null werden laut dieser Literaturstelle demnach im Atem kaum von der Hintergrundbelastung beeinflusst, während für Stoffe mit Werten nahe Eins ein starker Einfluss der Umgebung vorliegt. Für die sieben von Španěl *et al.* untersuchten Substanzen weist Formaldehyd mit 0,03 den niedrigsten Retentionskoeffizienten und n-Pentan mit 0,81 den höchsten auf. Substanzen mit einem Retentionskoeffizienten $< 0,1$ sollen im Zusammenhang mit der Hintergrundbelastung als irrelevant betrachtet werden können. Allerdings ist anhand der von Španěl *et al.* [158] vorgeschlagenen Blindwertkorrektur, bei der der Gehalt im Atem um den mit dem Retentionskoeffizienten multiplizierten Hintergrundgehalt reduziert wird, zu erkennen, dass neben dem Retentionskoeffizienten auch die Konzentration in der Umgebungsluft maßgeblich dafür ist, ob eine Hintergrundbeeinflussung vorliegt. Ein Blindwerteinfluss wird auch für eine Substanz mit einem geringen Retentionskoeffizienten von 0,1 oder niedriger auftreten, wenn die Hintergrundbelastung den eigentlichen Probengehalt deutlich übersteigt.

In der Publikation von Fuchs *et al.* [16] wurde eine Blindwertkorrektur der Aldehydgehalte in der Atemluft durch Subtraktion der Hintergrundgehalte, jedoch ohne substanzspezifischen Faktor, durchgeführt; negative Ergebnisse wurden Null gesetzt. Auch Filipiak *et al.* [20] subtrahierten den analysierten Blindwert von den Atemgehalten, gaben allerdings auch negative Werte in Form von alveolaren Gradienten an und bewerteten diese. In anderen Studien wurde versucht, die Hintergrundproblematik dadurch zu umgehen, dass die Teilnehmer im Vorfeld der Probenahme eine definierte Zeit gereinigte Luft atmeten [192-194]. Bereits wenige Minuten reichen aus, um die Lunge von der Hintergrundkontamination mit z. B. n-Pentan frei zu waschen. All diese Varianten berücksichtigen allerdings nur den „akuten“ Einfluss der VOC-Gehalte der Umgebung während der Probenahme. Hingegen wird mit diesen Verfahren nicht beachtet, in welcher Atmosphäre der Probengeber sich z. B. eine Stunde vorher, einen Tag vorher oder darüber hinaus aufgehalten hat. Morita *et al.* [192] bestimmten eine Auswaschzeit mit VOC-freier Luft von 90 min, bevor das aufgenommene n-Pentan abgeatmet war und konstante Gehalte im Atem erhalten wurden. Springfield und Levitt [195] hingegen ermittelten in einem Tierversuch an Ratten, die 20 h in einer hochbelasteten n-Pentan-Atmosphäre gehalten wurden, dass auch nach über 8 h das mutmaßlich im Fettgewebe kumulierte n-Pentan noch nicht wieder ausgewaschen war. Damit war mit der ursprünglich hohen

Exposition eine relativ langfristige Beeinflussung der VOC-Gehalte in der Atemluft verbunden. Auch für Acetonitril wurde gezeigt, dass Raucher fast eine Woche rauchfrei bleiben müssen, bevor die Konzentration in der Atemluft auf das Niveau von Nichtrauchern abgesunken war [196]. Solche langfristigen Effekte können weder durch die Blindwertkorrektur noch durch das Auswaschen der Lunge mit praktikablen Zeitregimen berücksichtigt werden. Folglich sind solche Korrekturmaßnahmen nicht geeignet, um VOC-Gehalte in der Atemluft zu erfassen, die ausschließlich auf einen endogenen Ursprung zurückzuführen sind.

Für die hier präsentierte Studie wurde keine Blindwertkorrektur der analysierten VOC-Gehalte in der Atemluft vorgenommen. Neben den bereits beschriebenen Ausführungen wurde bei dieser Entscheidung zusätzlich berücksichtigt, dass die VOC-Gehalte in der Umgebungsluft auf Basis der gleichen Qualitätskontrollstandarduntersuchungen berechnet wurden, die auch für die Auswertung der Atemgehalte zur Anwendung kamen. Allerdings unterscheiden sich die Qualitätskontrollstandardproben und die Blindwertproben in ihrem Feuchtigkeitsgehalt. Da die angewendete SPME-Technik eine matrixsensitive Extraktionsmethode ist, wurden durch dieses Vorgehen nur Näherungswerte, aber keine korrekten VOC-Gehalte für die Blindwertproben erhalten. Andererseits konnte die Blindwertproblematik nicht einfach ignoriert werden. Aus diesem Grund wurden solche Ziel-VOC, die als hintergrundbeeinflusst festgestellt wurden, bei der Erstellung eines potentiellen Biomarkersets als ungeeignete Kandidaten eingestuft.

Nachdem nun hintergrundbeeinflusste Zielsubstanzen identifiziert worden waren, konnte die Überprüfung des Einflusses des Rauchverhaltens folgen. Auch hier wurde zusätzlich zur Auswertung der Studie ein Eigenversuch durchgeführt.

4.2.5 Einfluss des Rauchens

Eigenuntersuchung zum Kurzzeiteinfluss des Rauchens auf das VOC-Profil der Atemluft

Ein Einfluss des Rauchens auf die Atemluftzusammensetzung ist bereits bekannt [61, 197, 198]. In einem Selbstversuch sollte für einen gelegentlichen Raucher geprüft werden, wie sich das Rauchen bezogen auf einen kurzen Untersuchungszeitraum von wenigen Stunden auf die 24 Zielsubstanzen auswirkte.

Durch das Rauchen eines Zigarillos wurde eine gravierende Änderung des VOC-Profiles in der Atemluft verursacht (Abbildung 54). Es konnten viele neue Signale von Aromaten, Heteroaromaten und Nitrilen beobachtet werden, die vor dem Rauchen nicht detektierbar waren; Koelutionen traten vermehrt auf, die die Auswertung einiger Zielsubstanzen beeinflusste.

Für alle auswertbaren Zielsubstanzen war ein Anstieg durch das Rauchen zu beobachten, welcher anschließend wieder auf das Anfangsniveau herab sank (Anhang Tabelle 35, Seite A-49). In der Abbildung 55 ist das beispielhaft für Benzen gezeigt. Dabei war bereits 10 min nach dem Rauchen wieder eine deutliche Absenkung des Benzengehalts in der Atemluft zu beobachten. Nach 30 min war das Ausgangsniveau nahezu wieder erreicht. Jordan *et al.* [196] zeigten für Benzen, dass der Gehalt in der Atemluft 30 bis 60 min nach dem Rauchen einer Zigarette wieder dem Anfangsniveau entsprach, während Gordon *et al.* [197] dies bereits nach 15 min feststellen konnten. Damit bestätigen die hier erhaltenen Ergebnisse eher die Beobachtungen der ersten Studie als die der zweiten.

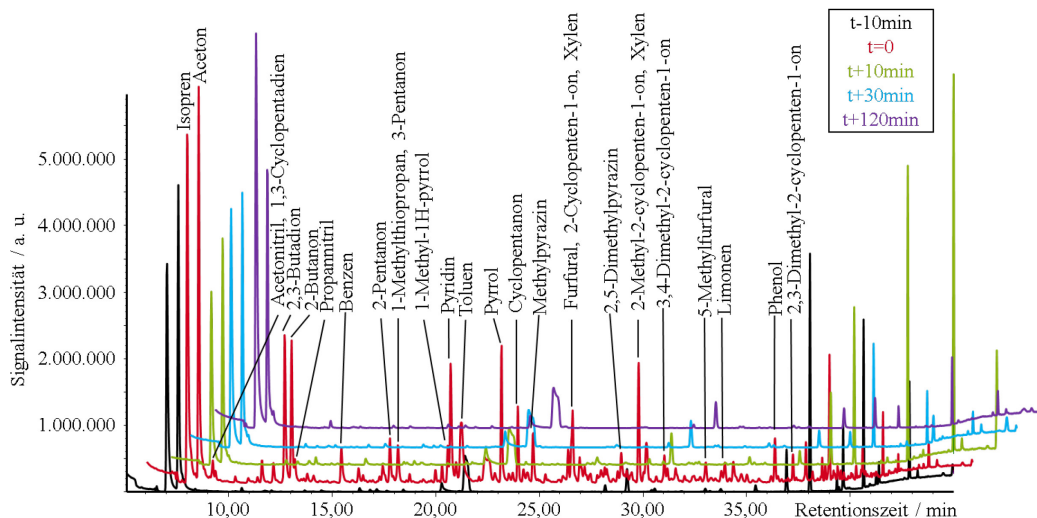


Abbildung 54: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Atemluftproben, die vor und nach dem Rauchen eines Zigarillos genommen wurden; direkt nach dem Rauchen ($t=0$, rot) lassen sich sehr viele zusätzliche Signale, vor allem Aromaten und Heteroaromaten, beobachten

Wenn der Einfluss von akutem Tabakkonsum auf das VOC-Profil im Atem vollständig ausgeschlossen sein sollte, hätte ausgehend von dem hier durchgeführten Experiment eine Wartezeit von 120 min etabliert werden müssen. Allerdings war nicht zu erwarten, dass ein aktiver Raucher bereitwillig für 2 h auf das Rauchen verzichten würde. Aus diesem Grund wurde die festgelegte Wartezeit von 30 min als Kompromiss beibehalten, zumal die VOC-Gehalte zu diesem Zeitpunkt nur geringfügig über dem Anfangsniveau lagen.

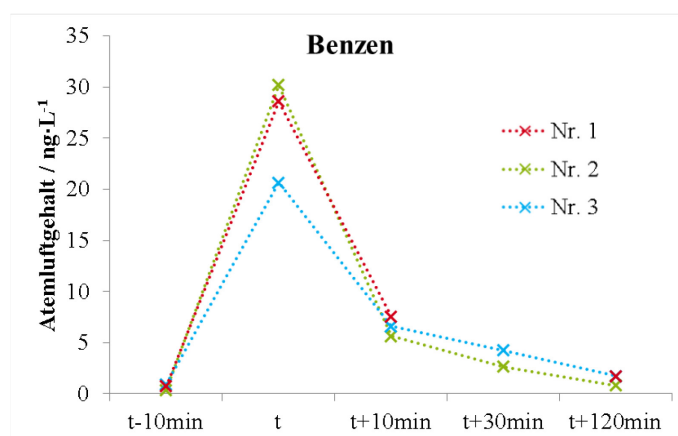


Abbildung 55: Verlauf des Benzengehalts in Atemluftproben nach Rauchen eines Zigarillos zum Zeitpunkt t (HS-SPME-GC-MS-Analyse in Gassammelrohr); bei Durchführung Nr. 1 erfolgte aufgrund von Softwareproblemen keine Datenaufzeichnung für die Atemluftprobenahme zum Zeitpunkt $t+30$ min

Dieser Versuch machte deutlich, dass alle untersuchten Zielsubstanzen zumindest für eine selten rauchende Person akut durch das Rauchen beeinflusst wurden. Ob auch eine chronische Beeinflussung vorlag, konnte mit diesem Experiment nicht überprüft werden; in diesem Fall könnte die entsprechenden Substanzen Biomarker für das Rauchverhalten sein. Unabhängig davon ist aufgrund der festgestellten akuten Beeinflussung der Atemluftzusammensetzung durch das Rauchen anhand der Studiendaten für jede einzelne Zielsubstanz zu prüfen, ob das Rauchen in Bezug auf die Erkennung von Lungenkrebs eine Störgröße darstellt. Diese Auswertung wird nachfolgend vorgestellt.

Auswertung der Studiendaten im Hinblick auf das Rauchverhalten

Zur Ermittlung von Biomarkern für das Rauchverhalten, die nicht als Biomarker für die Lungenkrebsdetektion geeignet sind, sollten die Studiendaten durch Anwendung eines univariaten statistischen Verfahrens ausgewertet werden. Dafür erfolgte zunächst für die Gruppen alle aktive Raucher ($n=25$) und alle Nichtraucher ($n=35$) unabhängig vom Gesundheitszustandes die Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwerts, Median, Minimal- und Maximalwert für jeden

Analyten unter Einbeziehung der Stellvertreterwerte, um die Daten mit Kennwerten zu beschreiben (Anhang Tabelle 43, Seite A-62).

Durch die grafische Veranschaulichung von Median und Interquartilabstand (Abbildung 56) konnte bereits ein erster Eindruck gewonnen werden, auf welche der Zielanalyten in der Atemluft ein relevanter Einfluss durch das Rauchen bestanden haben könnte. Vor allem für Benzen und Ethylbenzen ließ sich bereits dadurch eine deutliche Erhöhung der Gehalte in der Atemluft der aktiven Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern feststellen.

Vor der Anwendung eines statistischen Tests zum Vergleich der Gruppen war zunächst zu prüfen, ob die Daten einer Normalverteilung oder einer logarithmischen Normalverteilung folgen und somit ein parametrischer Test anwendbar war. Bei fehlender Normalverteilung würde ein nicht-parametrischer Test zur Anwendung kommen.

Der Test auf Vorliegen einer Normalverteilung wurde durchgeführt, indem die Daten der 60 Atemluftproben für die 21 verbliebenen Zielsubstanzen (vgl. Kapitel 4.2.3) nach dem Rauchverhalten (aktiv und nicht aktiv) gruppiert wurden. In diesen Gruppen erfolgte für jede Substanz einzeln der Test auf Normalverteilung der gemäß Kapitel 4.2.3 vorbehandelten Daten als auch für die logarithmierten Werte unter Anwendung von fünf verschiedenen Tests (Shapiro-Wilk, Lilliefors, Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling, Chen-Shapiro) mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Die Hypothese der Normalverteilung wurde angenommen, wenn sich für mindestens drei der fünf Einzeltests keine Hypothesenablehnung ergab.

Beim Test auf Normalverteilung wurde nur für je eine Zielsubstanz je Gruppe eine Bestätigung erzielt (Anhang Tabelle 41, Seite A-60). Der Test auf Normalverteilung von logarithmierten Daten zeigte für acht VOC für Nichtraucher und 13 VOC für aktive Raucher eine logarithmische Normalverteilung (Anhang Tabelle 42, Seite A-61). Von daher folgen die Analysenwerte eher einer logarithmischen Normalverteilung als einer Normalverteilung, allerdings auch nicht für alle Substanzen. Da weder die Hypothese der Normalverteilung noch der logarithmischen Normalverteilung für die Analysendaten angenommen werden konnte, wurde die univariate Auswertung der Daten mit einem nicht-parametrischen Test, dem Mann-Whitney-U-Test, vorgenommen.

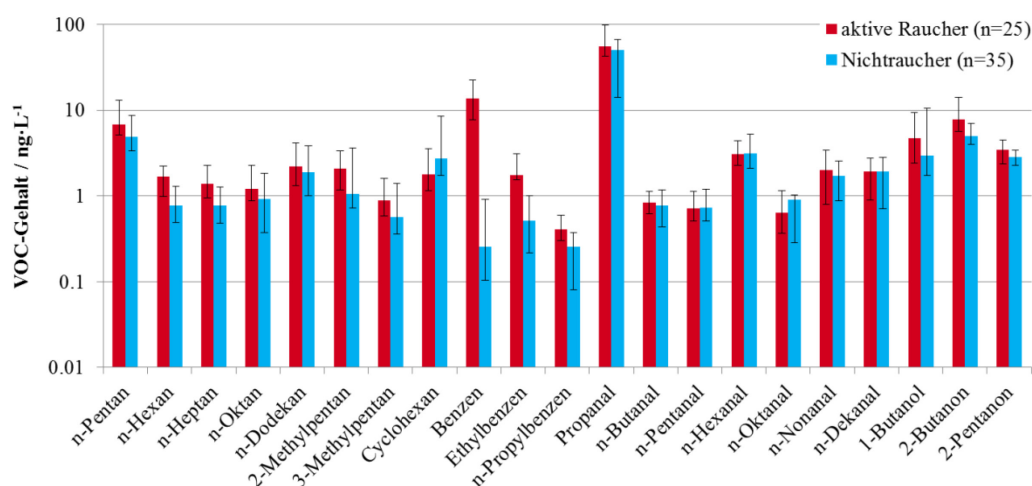


Abbildung 56: Vergleich des Gehalts von 21 VOC in der Atemluft von allen Rauchern und allen Nichtrauchern analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Median und Interquartilabstand in logarithmischer Auftragung)

Durch Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests wird für jeden Analyten ein p -Wert erhalten. Ist dieser p -Wert kleiner als 0,05, so wird der Gehaltsunterschied der Substanz in der Atemluft von aktiven Rauchern und Nichtrauchern als signifikant betrachtet; wenn der p -Wert unter 0,001 liegt, ist von einem höchst signifikanten Unterschied auszugehen. In Übereinstimmung mit der grafischen Vorbetrachtung waren die Gehalte der drei Aromaten (Benzen, Ethylbenzen, n-Propylbenzen) in den Atemluftproben der aktiven Raucher höchst signifikant erhöht (Abbildung 57). Darüber hinaus wurde

eine signifikante Erhöhung der Gehalte der Alkane n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan, n-Oktan und des Ketons 2-Butanon im Raucheratem festgestellt (Anhang Tabelle 43, Seite A-62). Dabei ist zu berücksichtigen, dass n-Pentan und n-Propylbenzen als hintergrundbeeinflusst festgestellt wurden (vgl. Kapitel 4.2.4) und die Aussagekraft der Ergebnisse für diese beiden Substanzen eingeschränkt ist.

Es ist ferner zu beachten, dass die beiden Gruppen aktive Raucher und Nichtraucher in Bezug auf den Gesundheitszustand unterschiedlich zusammengesetzt waren (Tabelle 17). Folglich konnte neben dem Einfluss des Rauchens auch ein Einfluss der Lungenkrebserkrankung vorliegen. Aus diesem Grund wurde der statistische Test für die Untergruppen der erkrankten Nichtraucher ($n=16$) und der erkrankten aktiven Raucher ($n=21$) wiederholt (Anhang Tabelle 45, Seite A-64); ein analoger Vergleich für die beiden anderen Untergruppen wurde nicht weiter berücksichtigt, weil die Gruppe gesunde aktive Raucher nur vier Objekte enthielt; damit hätte eine statistische Auswertung keine Aussagekraft. Benzen und Ethylbenzen waren auch für die Untergruppen der erkrankten Nichtraucher und der erkrankten aktiven Raucher höchst signifikant verschieden, während n-Propylbenzen in beiden Gruppen vergleichbare Gehalte aufwies (Abbildung 57). Bei Betrachtung der nicht-aromatischen VOC blieb nur für n-Heptan ein signifikanter Einfluss des Rauchens bestehen.

Für den Benzengehalt im Atem wurden im Rahmen dieser Studie für die Nichtraucher $0,1\text{--}11,3\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Median $0,3\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) ermittelt und für die aktiven Raucher $2,2\text{--}38,4\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Median $13,6\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$). Die hier bestimmten Benzengehalte befinden sich in einer ähnlichen Größenordnung wie Literaturangaben (Tabelle 19, ab Seite 95): Buszewski *et al.* [76] ermittelten im Atem Benzengehalte im Bereich von $1,3\text{--}15,0\text{ ppb}$ (ca. $4\text{--}48\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) und Ulanowska *et al.* [18] solche bis 19 ppb (ca. $61\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$); in beiden Studien wurden für Raucher signifikant erhöhte Werte in der Atemluft im Vergleich zu Nichtrauchern festgestellt. Poli *et al.* [66] fanden, dass sich die Benzengehalte sowohl im Atem von Lungenkrebspatienten und gesunden Rauchern als auch von Lungenkrebspatienten und gesunden Nichtrauchern unterscheiden. Filipiak *et al.* [199], Gaida *et al.* [22] und Ueta *et al.* [200] ermittelten ebenso, dass der Benzengehalt im Atem durch Rauchen beeinflusst wird. Yu *et al.* [69] hingegen postulierten Benzen als Lungenkrebsmarker.

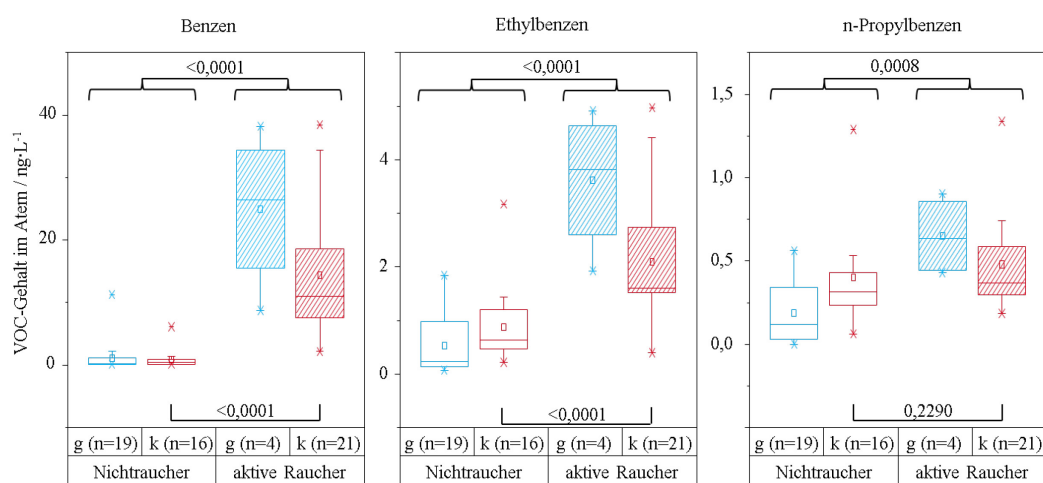


Abbildung 57: Boxplotdarstellung für die Aromatengehalte in der Atemluft von aktiven Rauchern und Nichtrauchern unter Angabe des p -Werts des Mann-Whitney-U-Tests für den Vergleich aller Nichtraucher ($n=35$) mit allen aktiven Rauchern ($n=25$, oben) sowie für die Untergruppen lungenkrebskranke Nichtraucher und kranke aktive Raucher (unten); g: gesund, k: lungenkrebskrank, n: Anzahl der Atemluftproben

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie konnten Ethylbenzengehalte im Atem von $0,1$ bis max. $5,0\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ bestimmt werden. Die von Poli *et al.* [66] publizierten Werte liegen mit $11\text{--}133\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (ca. $1\text{--}14\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) in einer ähnlichen Größenordnung, während Buszewski *et al.* [76] mit $2\text{--}18\text{ ppb}$ (ca. $10\text{--}80\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) einen deutlich höheren Bereich angeben. In der erstbenannten Publikation wurde belegt, dass sich der Ethylbenzengehalt in der Atemluft in Abhängigkeit des Rauchverhaltens verändert,

während in der zweiten zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen Lungenkrebspatienten und gesunden Rauchern ermittelt wurde. Weitere Arbeitsgruppen bewiesen einen Einfluss des Rauchens auf den Ethylbenzengehalt in der Atemluft [22, 199].

Der Gehalt der Substanz n-Propylbenzen in der Atemluft wurde bisher nur selten analysiert. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte ein Gehalt von $1,34 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ als Maximalwert beobachtet werden. Yu *et al.* [69] bestimmten deutlich höhere Gehalte zwischen 800 und $3200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ und konnten diesen Aromaten nur im Atem von Lungenkrebspatienten feststellen.

Die wahrscheinlichste Ursache für die erhöhte Konzentration von Aromaten im Atem aktiver Raucher ist der direkte Eintrag mit dem Rauch [201]; eine endogene Bildung der Aromaten ist unwahrscheinlich. Allerdings war in dem Selbstversuch zum Rauchen festgestellt worden, dass bei einmaliger Exposition einer nur selten rauchenden Person binnen 120 min für die Gehalte der Aromaten in der Atemluft wieder das Niveau vor dem Rauchen erreicht war. Nach Auskunft der aktiven Raucher hatten diese für 40 min bis 5760 min (Median: 210 min) vor der Probenahme der Atemluftprobe mit dem Gassammelrohr nicht geraucht. Deshalb ist nicht von einer akuten Beeinflussung der Atemzusammensetzung durch das Rauchen auszugehen. Entsprechend scheint bei den aktiven Rauchern ein höheres Grundniveau für die Gehalte der Aromaten in der Atemluft vorzuliegen. Es ist bekannt, dass Benzen in Gewebe mit hohem Fettanteil oder hohen Perfusionsraten aufgenommen wird; unmetabolisiertes Benzen konnte bei akuter hoher Exposition bereits in Gehirn, Leber, Niere, Magen, Abdominalfett und Urin nachgewiesen werden [202]. Aus *in-vivo*- und Humanstudien zur Exhalation von Benzen ist bekannt, dass zunächst eine Phase mit zügiger Benzenabatmung stattfindet, die von einer langsameren Phase gefolgt wird [202]. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die chronische Exposition mit Benzen von aktiven Rauchern zu einer Akkumulation im Körper führt [202]. Diese könnte zu einer längerfristigen Erhöhung des Aromatengehaltes in der Atemluft durch das Rauchen führen. Zumindest für die Substanz Acetonitril, deren Aufnahme auch mit der Inhalation von Zigarettenrauch stattfindet, wurde beobachtet, dass aktive Raucher eine Woche rauchfrei bleiben mussten, bevor der Acetonitrilgehalt in der Atemluft auf das Niveau von Nichtrauchern abgesunken war [196].

Für Benzen und Ethylbenzen ist sehr gut zu erkennen, dass die Gehalte im Atem von Rauchern und Nichtrauchern signifikant unterschiedlich waren. Dabei war der Unterschied für Benzen so groß, dass die beiden Gruppen nahezu nicht überlappen, was gleichbedeutend mit einer hohen Trennschärfe ist. Wird eine Entscheidungsgrenze für den Benzengehalt in der Atemluft von $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ verwendet, so erfolgt die Zuordnung zu der Gruppe aktiver Raucher mit 100 % Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) und 91,4 % Spezifität (Richtig-Negativ-Rate). Für Ethylbenzen wird hingegen deutlich, dass trotz eines höchst signifikanten Unterschiedes die beiden Gruppen stärker überlappen. Im besten Fall kann eine Unterscheidung mit 88,0 % Sensitivität und 94,3 % Spezifität erreicht werden. Folglich besitzt Ethylbenzen als Parameter für eine Klassifizierung einer Atemluftprobe zu aktiver Raucher oder Nichtraucher eine geringere Trennschärfe.

Für lungenkrebskranke Nichtraucher wurden in unserer Studie n-Heptangehalte von $0,4\text{--}76,5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Median $0,8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) und für lungenkrebskranke Raucher von $0,3\text{--}21,6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Median $1,2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) bestimmt; damit wurden tendenziell höhere Gehalte für n-Heptan in der Atemluft aktiver Raucher analysiert. Poli *et al.* [66] beschreiben Gehalte in einer vergleichbaren Größenordnung für Lungenkrebspatienten mit einem Interquartilbereich von $1,5\text{--}34,0 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (ca. $0,1\text{--}3,4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) und einem Median von $13,5 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$); ferner wurde auch in dieser Publikation ein signifikanter Unterschied der n-Heptangehalte im Atem von gesunden Nichtrauchern und aktiven Rauchern angegeben. Ebenso ermittelten Gaida *et al.* [22] eine Beeinflussung des n-Heptangehalts in der Atemluft durch das Rauchen. Auch können im Zigarettenrauch diverse Alkane einschließlich des n-Heptans nachgewiesen werden [203], so dass ein exogener Eintrag möglich ist. Darüber hinaus

verursacht Rauchen vermehrt oxidativen Stress [8]. Dadurch könnte die Lipidperoxidation verstärkt werden. Ölsäure stellt einen potentiellen Precursor für n-Heptan dar [72].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Atemgehalte von Benzen, Ethylbenzen und n-Heptan durch das Rauchverhalten beeinflusst wurden. Die Übereinstimmung dieses Ergebnisses mit Literaturangaben wird als Indiz für die Eignung der eingesetzten Methode zur Atemluftanalyse gewertet.

Da nun festgestellt wurde, welche der Zielanalyten vom Rauchverhalten im Sinne einer Störgröße beeinflusst wurden, konnte die Identifizierung von univariaten Biomarker für die Lungenkrebsdetektion erfolgen.

4.2.6 Einfluss des Gesundheitszustands und Biomarkeridentifikation

Nachdem nun sowohl blindwert- als auch rauchverhaltenbeeinflusste VOC identifiziert wurden, konnte die Auswertung der Daten zur Ableitung von Biomarkerkandidaten für die Lungenkrebsdetektion beginnen. Diese erfolgte mit uni- und multivariaten statistischen Verfahren.

Zur Ermittlung von Biomarkern für die Lungenkrebserkennung mit einer univariaten Methode wurden die 21 Zielanalyten für diese beiden Gruppen (alle Lungenkrebskranke und alle Gesunde unabhängig vom Rauchverhalten) einzeln betrachtet, indem zunächst die Berechnung einiger Kenngrößen erfolgte (Anhang Tabelle 43, Seite A-62). Eine grafische Veranschaulichung von Median und Interquartilabstand für die beiden Gruppen ist geeignet, um einen ersten Überblick zu gewinnen (Abbildung 58).

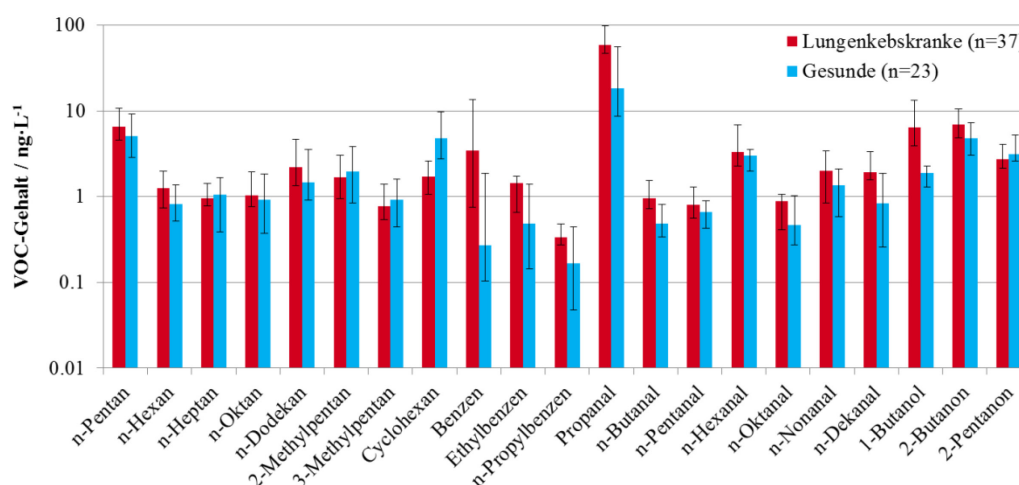


Abbildung 58: Vergleich des Gehalts von 21 VOC in der Atemluft von Lungenkrebskranken und Gesunden analysiert mit HS-SPME-GC-MS (Median und Interquartilabstand in logarithmischer Auftragung)

Es war erneut zu prüfen, welche Datenverteilung der 60 Atemluftproben bei Einteilung in Kranke und Gesunde vorlag. Dabei stellte sich für keine Zielsubstanz eine Normalverteilung der bestimmten Gehalte heraus (Anhang Tabelle 41, Seite A-60). Der Test auf Normalverteilung von logarithmierten Daten zeigte für sechs Substanzen bei Lungenkrebspatienten und für 14 Substanzen bei gesunden Studienteilnehmern eine logarithmische Normalverteilung (Anhang Tabelle 42, Seite A-61). Folglich wurde die univariate Auswertung zur Identifizierung von Biomarkern wiederum mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test vorgenommen.

Durch Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests können höchst signifikante Unterschiede für 1-Butanol, Cyclohexan und die Aldehyde Propanal und n-Butanal festgestellt werden (Anhang Tabelle 43, Seite A-62). Des Weiteren treten signifikante Unterschiede für 2-Butanon, n-Dekanal und die drei Aromaten Benzen, Ethylbenzen und n-Propylbenzen auf. Werden nur die nichtrauchenden Kranken und Gesunden verglichen (Anhang Tabelle 44 und Anhang Tabelle 45, ab Seite A-63), so weist n-Dekanal einen höchst signifikanten Unterschied auf, während Cyclohexan signifikant ist und für

Benzen keine Diskriminierung mehr beobachtet werden kann; dafür ist aber eine signifikante Erhöhung der Gehalte an n-Pentanal, n-Hexanal und n-Dodekan im Atem von nicht-rauchenden Lungenkrebspatienten zu erkennen. Für einige dieser Substanzen sind in Abbildung 59 die Gehalte als Boxplots dargestellt.

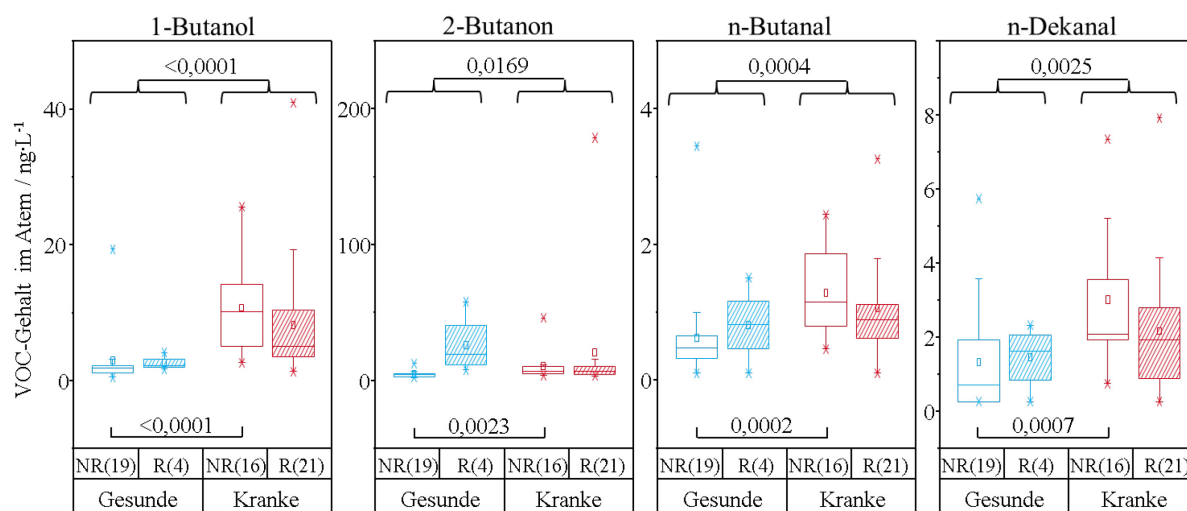


Abbildung 59: Boxplotdarstellung für die Gehalte ausgewählter VOC in der Atemluft von Gesunden und Lungenkrebskranken unter Angabe des p -Werts des Mann-Whitney-U-Tests für den Vergleich aller Gesunden ($n=23$) mit allen Kranken ($n=37$, oben) sowie für die Untergruppen lungenkrebskranke Nichtraucher und gesunde Nichtraucher (unten); NR: Nichtraucher, R: aktiver Raucher, Angabe in Klammern gibt die Anzahl der Atemluftproben an

In Tabelle 19 (ab Seite 95) sind für die 21 Zielanalyten die analysierten Gehalte im Vergleich zu ausgewählten Literaturdaten angegeben. Für die Lungenkrebskranken und Gesunden sowie die Untergruppe der nichtrauchenden Kranken und Gesunden ist angegeben, ob sich die Gehalte in der Atemluft signifikant unterschieden. Die beobachteten signifikanten Unterschiede waren mit einer Erhöhung der VOC-Gehalte im Atem der Lungenkrebskranken im Vergleich zu den Gesunden verbunden; einzige Ausnahme war Cyclohexan, welches im Atem der gesunden Probanden erhöht vorlag. Die Literaturdaten enthalten ebenso Angaben darüber, ob signifikante Unterschiede zwischen gesunden Studienteilnehmern und Lungenkrebspatienten berichtet wurden. Ferner sind ausgewählte Literaturstellen angegeben, in denen weitere potentielle Einflussfaktoren auf die Gehalte einzelner VOC in der Atemluft benannt sind. Im Weiteren wird auf ausgewählte Analyten näher eingegangen.

Die Substanz **1-Butanol** scheint als potentieller Biomarker für die Lungenkrebsdetektion am interessantesten zu sein. Der Gehalt war in der Atemluft von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden höchst signifikant erhöht. Song *et al.* [83] berichten dies ebenso für die von ihnen untersuchten Atemluftproben. Bei Betrachtung der Einzelwerte unserer Studie wird deutlich, dass eine korrekte Klassifizierung aufgrund des Gehaltes von 1-Butanol in der Atemluft nur eingeschränkt möglich ist. Wird eine einzelne Entscheidungsgrenze von $2,3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ abgeleitet, so dass alle Atemluftproben entweder als krank oder als gesund klassifiziert werden, ergäbe sich eine Sensitivität von 92 % und eine Spezifität von 78 % (Abbildung 60). Damit erhält man bereits eine gute, jedoch keine vollständig korrekte Zuordnung.

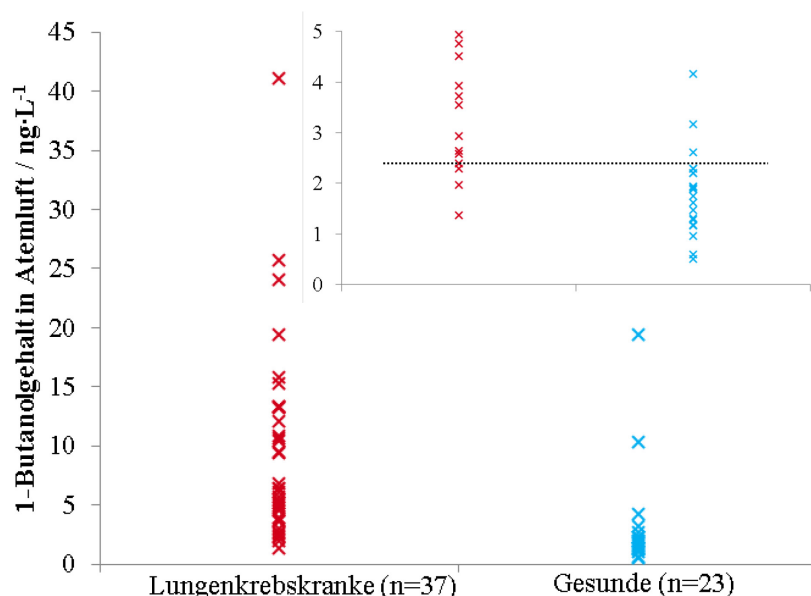


Abbildung 60: Einsatz von 1-Butanol als univariater Marker für die Kategorisierung von Atemluftproben; Ausschnitt: durch eine Entscheidungsgrenze bei $2,3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ werden 3 Patienten und 5 Gesunde falsch klassifiziert

Für 1-Butanol sind potentielle Metabolisierungswege bekannt: Zum einen ist eine Oxidation von n-Butan durch Cytochrom P450 im Rahmen der Phase-I-Metabolisierung möglich; eine solche wurde in Säugetieren für die Alkane n-Hexan und n-Oktan beschrieben [204-206]. Erhöhte Gehalte für n-Butan in der Atemluft von Lungenkrebspatienten wurden bereits berichtet [18, 60]; dieser Precursor wiederum kann durch Lipidperoxidation von Myristoleinsäure oder Linolensäure entstehen [72]. Zum anderen katalysiert Alkoholdehydrogenase reversibel die Oxidation von 1-Butanol zu n-Butanal [207]; n-Butanal war in unserer Studie in der Atemluft von Lungenkrebskranken ebenfalls erhöht. Entsprechend ist eine endogene Bildung von 1-Butanol plausibel (Abbildung 61). Allerdings wurde 1-Butanol auch im Zusammenhang mit dem Wachstum von Bakterien untersucht: in Kulturen von *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* [208] sowie *Staphylococcus aureus* [209, 210], die entzündliche Krankheiten der Atemwege verursachen können, wurde unter anderem eine Bildung von 1-Butanol beobachtet. Auch andere Bakterien bilden 1-Butanol *in vitro* [211].

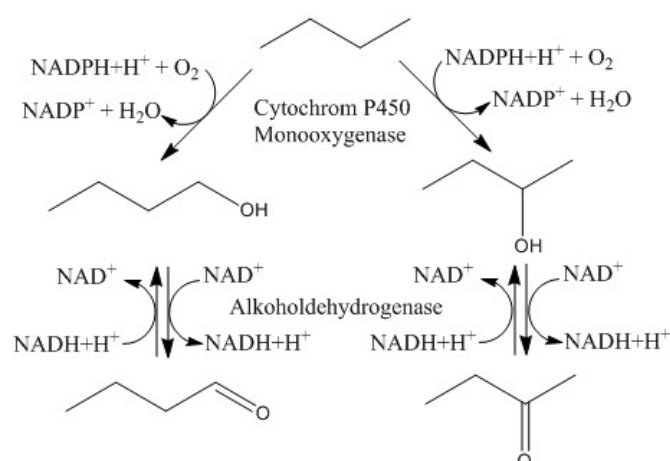


Abbildung 61: Ein möglicher endogener, aus Literaturangaben (s. Text) zusammengetragener Bildungsweg von 1-Butanol, n-Butanal und 2-Butanon
NADP: Nicotinsäureamidadenin dinukleotidphosphat
NAD: Nicotinsäureamidadenin dinukleotid

In unserer Studie wurde die Substanz **2-Butanon** im Atem von Patienten mit einem höheren Gehalt als in dem von gesunden Studienteilnehmern beobachtet (Abbildung 59). Buszewski *et al.* [76] stellten einen vergleichbaren Trend fest. Auch in dem von Ligor *et al.* [67] vorgeschlagenen Biomarkerset zur Lungenkrebserkennung ist 2-Butanon enthalten. Andererseits beobachtete Kischkel *et al.* [78] bei der Untersuchung der Atemluftproben von insgesamt 90 Probanden keine signifikante Erhöhung bei den Lungenkrebspatienten im Vergleich zu gesunden Studienteilnehmern. Ein endogener Ursprung von 2-

Butanon ist ausgehend von einer Oxidation von 2-Butanol durch Alkoholdehydrogenase plausibel [212]. Der Vorläufer 2-Butanol könnte als Fuselalkohol aufgenommen werden [213], als Aromastoff mit Lebensmitteln oder Kosmetik oder aus einer Oxidation von n-Butan (s. oben) resultieren. Metaboliten von 2-Butanon in Säugetieren sind 2-Butanol, 3-Hydroxy-2-butanon und 2,3-Butandiol [214, 215]. Erhöhte Konzentrationen von 3-Hydroxy-2-butanon in der Atemluft wurden bereits im Zusammenhang mit Lungenkrebs beschrieben [83], so dass damit ein zusätzliches Indiz für einen Einfluss der Lungenkrebserkrankung auf die Bildung und die Metabolisierung von 2-Butanon vorliegt. Andererseits findet sich 2-Butanon auch im Atem von aktiv und passiv rauchenden Personen [15]. Ferner wurde diese Substanz im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen beschrieben: Garcia *et al.* [156] beobachteten 2-Butanon im Atem von Patienten mit fortgeschrittenem Kehlkopfkrebs. Gaida *et al.* [22] ermittelten einen Einfluss einer COPD-Erkrankung. Bei Ratten konnten erhöhte 2-Butanongehalte mit akutem Leberversagen in Zusammenhang gebracht werden [216]. Ulanowska *et al.* [17] stellten einen geringen Einfluss einer Infektion mit *Helicobacter pylori* auf den Atemgehalt von 2-Butanon fest. Ferner wurde 2-Butanon in *in vitro* von *Pseudomonas aeruginosa* – ein bei beatmungsassoziiierter Pneumonie nachweisbares Bakterium – gebildet [210]. 2-Butanon ist darüber hinaus eines der wichtigsten industriell genutzten Ketone. Es wird als Lösungsmittel in der Kunststoffherstellung und als Vergällungsmittel in Ethanol eingesetzt [217], so dass auch ein exogener Eintrag möglich ist.

Darüber hinaus konnte eine signifikante Erhöhung der Gehalte einiger **Aldehyde** im Atem von Lungenkrebspatienten beobachtet werden. Für Propanal sind unsere ermittelten Gehalte im Bereich 3-214 ng·L⁻¹ im Vergleich mit einigen Literaturangaben sehr hoch [18, 76], während Kischkel *et al.* [78] eine ähnliche Größenordnung feststellten. Signifikante Unterschiede in den Atemluftpropanalgehalten von Lungenkrebspatienten und Gesunden wurden in einigen Studien mit 73 [76] bzw. 68 [77] Probanden beschrieben in denen das Rauchverhalten eine Störgröße darstellte, während in einer weiteren Studie mit nur 36 Teilnehmern [16] keine signifikante Beeinflussung des Propanalgehaltes beobachtet wurde. Diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Studien könnten durch die verschiedenen Probenzahlen bedingt sein; außerdem wird die Propanalkonzentration im Atem durch den Gehalt der Umgebungsluft beeinflusst. Die Substanz n-Butanal, welche im Atem von Lungenkrebspatienten erhöht vorkommt, wurde ebenso in einigen anderen Studien mit Lungenkrebs in Zusammenhang gebracht [76-78], während in einer weiteren Publikation keine Beeinflussung beschrieben wurde [16]. Die Aldehyde n-Pentanal und n-Hexanal wurden mehrfach als signifikant erhöht bei Lungenkrebspatienten beschrieben [16, 77] – für n-Hexanal konnten erhöhte Gehalte auch in Blut [82] und Urin [79] beobachtet werden – während für die Konzentration von n-Dekanal im Atem bisher keine Veränderung in Abhängigkeit von einer Lungenkrebserkrankung beschrieben wurde [16]. Obwohl in der Literatur eine Erhöhung der Gehalte von n-Oktanal und n-Nonanal im Atem von Lungenkrebskranken aufgezeigt ist [16, 77], konnte dies durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden. Insgesamt betrachtet, wurden Aldehydgehalte jedoch wiederholt als signifikant erhöht in der Atemluft beobachtet. Eine mögliche Ursache für erhöhte Aldehydgehalte bei einer Lungenkrebserkrankung könnte ein Zusammenhang mit der Lipidperoxidation sein, bei der Aldehyde als sekundäre Reaktionsprodukte gebildet werden [34]. Prinzipiell ist Krebs [218], und auch speziell Lungenkrebs [219], mit erhöhtem oxidativen Stress während der Initiation und der Progression assoziiert. Es soll an dieser Stelle allerdings darauf hingewiesen werden, dass veränderte Aldehydgehalte in Humanproben (Atemgas, Atemkondensat, Blut, Urin) auch im Zusammenhang mit anderen Faktoren, die teilweise auch mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen, beschrieben wurden, z. B. bei Ozonexposition [185, 220], Radfahren [221], Luft anhalten [121], COPD und Asthma [222]. Ferner wurde durch Bakterien und Pilze, die mit verschiedenen Lungenkrankheiten assoziiert sein können, *in vitro* eine Beeinflussung der Aldehydkonzentration im Gasraum beobachtet [21, 208-210, 223-225].

Obwohl für Ethylbenzen bereits ein Einfluss des Rauchverhaltens festgestellt wurde, kann in unserer Studie zusätzlich ein Einfluss durch die Lungenkrebserkrankung beobachtet werden (Anhang Tabelle 45, Seite A-64). Ein vergleichbares Phänomen wurde auch von Buszewski *et al.* [76] beschrieben. Ein kausaler Zusammenhang mit der Erkrankung ist jedoch fragwürdig, da kein endogener Bildungsmechanismus bekannt ist; eventuell wird das exogen zugeführte Ethylbenzen in Abhängigkeit des Gesundheitszustandes unterschiedlich metabolisiert.

Die in der Atemluft von Gesunden signifikant erhöhten Cylohexanwerte im Vergleich zu den Kranken sind eindeutig als Artefakt zu bewerten. Für Cyclohexan wurde ein relevanter Einfluss der Umgebung auf die Gehalte in der Atemluft ermittelt (vgl. Kapitel 4.2.4). Darüber hinaus wurde die Probenahme für mehr als 50% der Gesunden in einem Raum mit eindeutig erhöhter Konzentration dieser Substanz in der Luft durchgeführt, während in den Probenahmeräumen der Patienten keine auffälligen Werte für Cyclohexan feststellbar waren. Ebenso ist für n-Propylbenzen und n-Dodekan ein Einfluss der Umgebungskonzentration anzunehmen, so dass auch für diese Substanzen ein Zusammenhang zwischen der Lungenkrebserkrankung und dem signifikanten Konzentrationsanstieg im Atem nicht geschlussfolgert werden kann. Für alle drei Substanzen wurde bisher auch keine plausible endogene Bildungsreaktion beschrieben.

Nachdem nun bereits durch die univariate statistische Auswertung potentielle Biomarker ermittelt werden konnten und eine erste Bewertung von Kandidaten stattgefunden hat, wurde im Weiteren mit einem multivariaten Ansatz nach potentiellen Biomarkersets gesucht. Dafür ist zunächst eine zusätzliche Vorbehandlung der Daten notwendig.

Tabelle 19 (Fortsetzung): Vergleich der bestimmten VOC-Gehalte in Atemluft (Angabe als Spanne) mit ausgewählten Literaturangaben

Substanz	eigene Ergebnisse			Literaturangaben			
	Gehalt/ ng·L ⁻¹	k vs. g	k (NR) vs. g (NR)	Gehalt/ ng·L ⁻¹ (andere Einheit)	Referenz	signifikanter Unterschied zwischen bestimmten Gruppen	Referenz
2-Methylpentan	0,4-27			3-38 (0,9-10,8 ppb)	[76]	nein	[76]
				11-345 (3-98 ppb)	[18]	ja	
				n. d.	[78]	ja	
				6-26 (66-299 pmol·L ⁻¹)*	[66]	vs. g	
				0,3-4,3 (3-50 pmol·L ⁻¹)**	[66]	vs. g (NR)	
3-Methylpentan	0,2-7,7			5-15 (63-174 pmol·L ⁻¹)*	[66]	vs. g (R)	[66]
				3-31 (0,9-8,9 ppb)	[76]		
				10-200 (3-57 ppb)	[18]	vs. g	
				n. d.	[78]		
				n. d.	[78]		
Cyclohexan	0,4-24,8	↓↓↓	↓				
Benzen	0,1-38,4	↑		4-48 (1,3-15,0 ppb)	[76]	ja	[76]
				0-61 (0-19 ppb)	[18]	nein	
				5-10 (62-132 pmol·L ⁻¹)*	[66]	vs. g (NR)	
				2-5 (28-69 pmol·L ⁻¹)**	[66]	vs. g (NR), (R)	
				7-58 (85-745 pmol·L ⁻¹)*	[66]	vs. g (R)	
Ethylbenzen	0,1-5	↑	↑	9-63 (0,1-0,8 nmol·L ⁻¹)	[78]	nein	[78]
				10-80 (1,5-18,4 ppb)	[76]	ja	
				20-388 (4,6-89,3 ppb)	[18]	ja	
						vs. g (NR)	
						vs. g (R)	
n-Propylbenzen	0,0-1,3	↑	↑	770-3210	[69]	nein	[69]
						ja	
						vs. g	

k: Lungenkrebskranker, g: Gesunder, R: aktiver Raucher, NR: Nichtraucher, n. d.: in Atemluftproben nicht nachweisbar; ↓/↑ (↓↓/↑↑): Abnahme/Zunahme des VOC-Gehalts in der Atemluft von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden mit einem Signifikanzniveau von 0,05 (0,001) bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests; *, **, ***: Interquantilabstand (25% bis 75% Perzentile) von Lungenkrebspatienten, gesunden Nichtrauchern und gesunden Rauchern, iv... *in vitro*

weitere Einflussfaktoren
(Auswahl)

Rauchen, COPD
Tuberkulose

Rauchen
COPD
Atemmanöver

Rauchen
COPD
Tuberkulose
Pneumonie
Tuberkulose

Referenz

[66]
[157]

[22,66,
76,78,
199,200]
[22,66]
[121]

[22,66,
199]
[22,66]
[157]
[21]
[157]

Tabelle 19 (Fortsetzung): Vergleich der bestimmten VOC-Gehalte in Atemluft (Angabe als Spanne) mit ausgewählten Literaturangaben

Substanz	eigene Ergebnisse		Literaturangaben					Referenz
	Gehalt/ ng·L ⁻¹	k vs. g ↑ ↑ ↑	k (NR) vs. g (NR)	Gehalt/ ng·L ⁻¹ (andere Einheit)	Referenz	signifikanter Unterschied zwischen bestimmten Gruppen	weitere Einflussfaktoren (Auswahl)	Referenz
Propanal	3-214	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	4-9	[76]	ja	Rauchen	[76]
				0,1-2,4	[16]	nein	Hintergrund	[76]
				0-0,2	[16]	nein	Geschlecht	[78]
				0-1,4	[16]	ja	<i>S. aureus</i> iv	[77]
				0-80	[18]	nein	<i>C. albicans</i> iv	[209]
n-Butanal	0,1-3,5	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	20-396	[78]	ja		[78]
				3,9-7,5	[76]	ja	Rauchen, Hintergrund	[76]
				0-0,3	[16]	nein	Atemmanöver	[16]
				0-0,4	[16]	ja	<i>M. tuberculosis</i> iv	[77]
				0-0,1	[16]	ja	<i>H. influenzae</i> iv	[78]
n-Pentanal	0,1-11	↑		12-1482	[78]			
				0-25	[18]	ja		[18]
				1,0-2,7	[16]	ja		[16]
				0-1,0	[16]	ja		[77]
				0-0,4	[16]	nein		[78]
n-Hexanal	0,3-61	↑		38-226	[78]			
				0-22	[18]	ja		[18]
				31-335	[78]	ja		[16]
				0,8-2,6	[16]	ja		[77]
				0-0,1	[16]	nein		[78]
n-Oktanal	0,1-3,7			0-0	[16]			
				3-11	[16]	ja		[16]
				0,5-3,6	[16]	ja		[77]
				0,1-2,1	[16]			
				2-4	[77]			

k: Lungenkrebskranker, g: Gesunder, R: aktiver Raucher, NR: Nichtraucher, n. d.: in Atemluftproben nicht nachweisbar; ↓/↑ (↓↓/↑↑): Abnahme/Zunahme des VOC-Gehalts in der Atemluft von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden mit einem Signifikanzniveau von 0,05 (0,001) bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests; *, **, ***: Interquantilabstand (25% bis 75% Perzentile) von Lungenkrebspatienten, gesunden Nichtrauchern und gesunden Rauchern; iv...*in vitro*

Tabelle 19 (Fortsetzung): Vergleich der bestimmten VOC-Gehalte in Atemluft (Angabe als Spanne) mit ausgewählten Literaturangaben

Substanz	eigene Ergebnisse		Literaturangaben			
	Gehalt/ ng·L ⁻¹	k vs. g (NR)	Gehalt/ ng·L ⁻¹ (andere Einheit)	Referenz	signifikanter Unterschied zwischen bestimmten Gruppen	Referenz
n-Nonanal	0,2-17,5	k (NR) vs. g (NR)	18-71 (128-496 pmol·L ⁻¹)* 3-14 (21-96 pmol·L ⁻¹)* 2-43 (15-300 pmol·L ⁻¹)* 4-9 (32-63 pmol·L ⁻¹)* 1-3 (7-23 pmol·L ⁻¹)*	[16] [16] [16] [77] [77]	ja k ja k vs. g vs. g (NR) (NR)	[16] [77] [157] [198] [227]
n-Dekanal	0,3-7,9	↑ ↑↑	13-153 (83-980 pmol·L ⁻¹)* 3-35 (17-222 pmol·L ⁻¹)* 13-153 (83-980 pmol·L ⁻¹)*	[16] [16] [16]	nein k vs. g [16]	Pneumonie <i>A. baumannii</i> iv [225] [225]
1-Butanol	0,5-41	↑↑↑ ↑↑↑	0,3-30,3 4,0-9,4 (1,4-3,2 ppb) 0-115 (0-39 ppb) 12-436 (0,2-6,0 nmol·L ⁻¹)	[83] [76] [18] [78]	ja k k (NR) vs. g vs. g (NR) (NR)	<i>S. pneumoniae</i> iv <i>H. influenzae</i> iv <i>S. aureus</i> iv [208] [208] [209,210]
2-Butanon	2,4-179	↑ ↑			ja k nein k [76] [78]	COPD <i>H. Pylori</i> -Infektion Kehlkopfkrebs Tuberkulose <i>P. aeruginosa</i> iv <i>S. pneumoniae</i> iv [22] [17] [156] [157] [210] [224]
2-Pentanon	0,9-16,1		6-31 (1,8-8,8 ppb) 0-187 (0-53 ppb)	[76] [18]	ja k vs. g (NR) (NR)	Rauchen <i>S. pneumoniae</i> iv <i>H. influenzae</i> iv <i>P. aeruginosa</i> iv Pneumonie [22] [208] [208] [210] [208]

k: Lungenkrebskranker, g: Gesunder, R: aktiver Raucher, NR: Nichtraucher, n. d.: in Atemluftproben nicht nachweisbar; ↓/↑ (↓↓/↑↑): Abnahme/Zunahme des VOC-Gehalts in der Atemluft von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden mit einem Signifikanzniveau von 0,05 (0,001) bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests; *, **, ***: Interquantilabstand (25% bis 75% Perzentile) von Lungenkrebspatienten, gesunden Nichtrauchern und gesunden Rauchern; iv...*in vitro*

Datenvorbehandlung für die multivariate Statistik

Neben der univariaten Auswertung der Analysendaten ist auch eine multivariate Betrachtung möglich. Aufbauend auf der Datenvorbehandlung für die univariate Auswertung waren bereits drei der ursprünglich 24 Zielsubstanzen ausgeschlossen worden. Ferner erfolgte der Ersatz von Fehlzeiten durch Stellvertreterwerte. Aus der Prüfung auf Normalverteilung war hervorgegangen, dass die Variablen eher einer logarithmischen Normalverteilung folgen. Für die geplante lineare Diskriminanzanalyse (LDA) sind normalverteilte Daten eine Voraussetzung. Deswegen wurden für die weiteren Berechnungen die logarithmierten Analysenwerte verwendet. Darüber hinaus erfolgte die Umformung der logarithmierten Analytgehalte in einheitenlose z-Scores, indem auf den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1 normiert wurde:

$$x_{iA} = \frac{x_i - \bar{x}}{s} \quad (2)$$

x_{iA} : autoskalierter logarithmierter Einzelanalytgehalt (z-Score)

x_i : i-ter logarithmierter Einzelanalytgehalt

\bar{x} : logarithmierter, mittlerer Analytgehalt

s : Standardabweichung der logarithmierten Analytgehalte

Gemäß der Horst'schen Regel (vgl. Kapitel 2.3.3) sollte das Verhältnis von Objekten zu Variablen wenigstens 3:1 betragen [152]. Da für die Auswertung 60 Atemluftproben zur Verfügung standen, waren streng genommen nur 20 Variablen für den Einbezug in die multivariate Auswertung zulässig. Damit war die Anzahl der 21 Variablen zu reduzieren. Bei der Auswahl der zu streichenden Analyten war es zielführend, gleich die Redundanz, also die Überbestimmung, abzubauen. Redundanz lässt sich gut mit Korrelationsmatrizen nach Pearson erkennen. Dabei erfolgte der Auftrag der analysierten VOC-Gehalte jeder Substanz gegen die VOC-Gehalte jeder anderen Substanz und es wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient (Formel (1), Seite 83) ermittelt. Das Verfahren entspricht dem, welches bereits zur Ermittlung von Hintergrundinflüssen angewendet worden war (vgl. auch Kapitel 4.2.4).

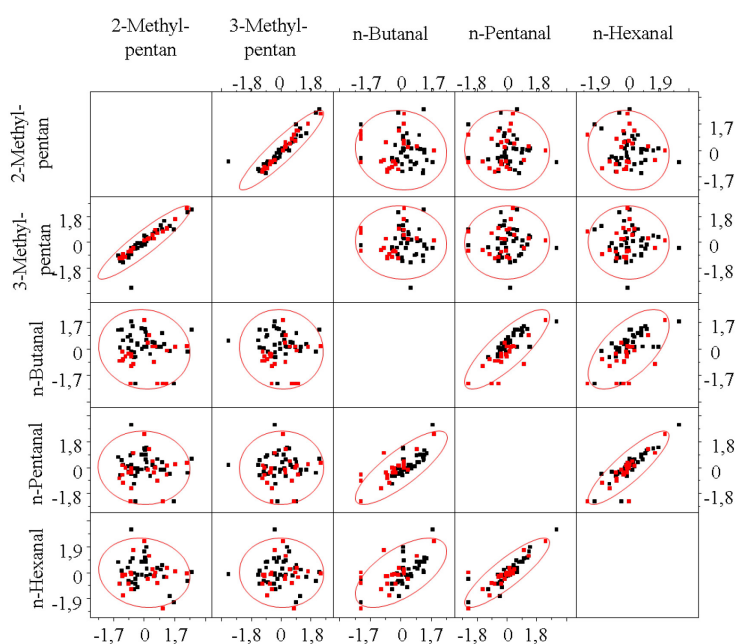


Abbildung 62: Korrelationsmatrix für fünf VOC durch Auftragung der autoskalierten, logarithmierten Gehalte

Die Berechnung der Korrelationsmatrix erfolgte für die 21 Zielsubstanzen (Anhang Tabelle 46, Seite A-65). Für die erste Reduktion wurden die Stoffpaare betrachtet, die einen Korrelationskoeffizienten oberhalb von 0,8 aufwiesen (Abbildung 62). Dies traf zum einen für die Auftragung des 2-Methylpentangehaltes gegen den 3-Methylpentangehalt zu. Für die weitere Auswertung wurde 2-Methyl-

pentan nicht berücksichtigt, da die Identifizierung des zugehörigen Signals in den Chromatogrammen der Atemluftproben aufgrund von Koelution des Qualifierfragments mit Matrixkomponenten mit einer höheren Unsicherheit behaftet war. Zum anderem konnte eine Korrelation für n-Pentanal mit n-Butanal und für n-Pentanal mit n-Hexanal beobachtet werden. In dieser Gruppe wurde n-Pentanal aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen, da es gleichzeitig mit zwei Substanzen hoch korreliert war.

Nachdem nun durch die Datenvorbehandlung 19 Analyten vorlagen, die logarithmiert und in z-Scores umgewandelt waren, konnte mit der multivariaten Datenanalyse begonnen werden.

Lineare Diskriminanzanalyse

Nach Abschluss der Vorbehandlung konnte für 19 Variablen mit der LDA ohne und mit Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOO) begonnen werden. Bei der LDA erfolgt, wie in Kapitel 2.3.3 dargelegt, die Berechnung eines Vorhersagemodells für die Klassifizierung von Objekten. Anschließend kann durch Vergleich der Vorhersage mit der realen Zuordnung die Sensitivität und die Spezifität abgeleitet werden. Die Fehlerrate des Modells entspricht dem Anteil der falsch klassifizierten Objekte an der Grundgesamtheit.

Für die LDA mit und ohne LOO wurde jeweils ein Modell mit einer kanonischen Variablen (Anhang Tabelle 47, Seite A-66) erhalten. Die einfache LDA ergab eine korrekte Zuordnung von 34 Lungenkrebspatienten (Sensitivität 92 %) und 22 Gesunden (Spezifität 96 %), was einer Gesamtfehlerrate von 7 % entspricht (Tabelle 20). Durch LDA-LOO ergaben sich deutlich niedrigere Sensitivitäten und Spezifitäten, was sich auch in einem höheren Klassifizierungsfehler von 18 % äußert. Daran ist zu erkennen, dass das anfänglich errechnete Modell sehr spezifisch für die während der Modellerstellung eingesetzten Objekte war und somit zu einer hohen Unsicherheit bei der Klassifizierung neuer Objekte führte. Gegebenenfalls ist hier aufgrund der hohen Anzahl an verwendeten Analyten zu viel Rauschen im Datensatz vorhanden bzw. Störgrößen könnten einen großen Einfluss haben.

Tabelle 20: Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) mit 19 Analyten mit und ohne Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOO); Angabe der Zuordnungsergebnisse als Anzahl und als prozentualer Anteil; Sensitivität und Spezifität sind hervorgehoben

		durch LDA mit 19 Analyten vorhergesagter Gesundheitszustand					
		einfache LDA			LDA LOO		
		Lungenkrebskranker	Gesunder	gesamt	Lungenkrebskranker	Gesunder	gesamt
real vorliegender Gesundheitszustand	Lungenkrebskranker	34	3	37	31	6	37
		92 %	8 %	100 %	84 %	16 %	100 %
	Gesunder	1	22	23	5	18	23
		4 %	96 %	100 %	22 %	78 %	100 %
	gesamt	35	25	60	36	24	60
		58 %	42 %	100 %	60 %	40 %	100 %
	Fehler						
				7 %			18 %

Im Weiteren wurde geprüft, ob auch mit einer geringeren Anzahl an Variablen eine Klassifizierung durch LDA-LOO möglich war. Die Reduktion des Datensatzes erfolgte dabei nach drei verschiedenen Ansätzen:

- Für den Ansatz 1 wurden die Korrelationskoeffizienten der Analyten als Basis verwendet. Es wurden schrittweise so viele Analyten entfernt, bis keine Korrelation mit einem Faktor größer 0,5 vorlag.
- In einem zweiten Ansatz wurden die Analyten ausgeschlossen, die als hintergrundbeeinflusst galten oder durch das Rauchverhalten beeinträchtigt wurden. Anschließend erfolgte eine Reduktion der noch bestehenden Redundanz auf Basis der Korrelationskoeffizienten.

- Bei Ansatz 3 wurde eine Vorauswahl der Analyten auf Basis der bisher gewonnen Erfahrungen getroffen. Dabei erfolgte gemäß Ansatz 2 der Ausschluss von hintergrund- und durch das Rauchen beeinflussten Substanzen. Darüber hinaus wurden weitere Substanzen entfernt, für die eine Hintergrundbeeinflussung aufgrund der Polarität bei erhöhten Blindwertgehalten vorstellbar wäre oder für die eine endogene Bildung nicht nachvollziehbar war.

Auf diese Weise wurden durch LDA-LOO Modelle auf der Basis von sieben oder vier Variablen mit Sensitivitäten von 84-92% und Spezifitäten von 87-96% berechnet (Tabelle 21).

Tabelle 21: Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) mit Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOO) für drei verschiedene Sets mit vier bis sieben Analyten; Angabe der Zuordnungsergebnisse als Anzahl und als prozentualer Anteil; Sensitivität und Spezifität sind hervorgehoben

		durch LDA-LOO vorhergesagter Gesundheitszustand								
		Ansatz 1 (7 Analyten)			Ansatz 2 (4 Analyten)			Ansatz 3 (4 Analyten)		
		k	g	gesamt	k	g	gesamt	k	g	gesamt
real vorliegender Gesundheitszustand	Lungenkrebskranker (k)	31	6	37	31	6	37	34	3	37
		84 %	16 %	100 %	84 %	16 %	100 %	92 %	8 %	100 %
	Gesunder (g)	1	22	23	2	21	23	3	20	23
		4 %	96 %	100 %	9 %	91 %	100 %	13 %	87 %	100 %
	gesamt	35	25	60	33	27	60	37	23	60
		58 %	42 %	100 %	55 %	45 %	100 %	62 %	38 %	100 %
Fehler		11 %			13 %			10 %		

Die Ergebnisse der LDA sind für die vier Variablen des Ansatzes 3 in Abbildung 63 grafisch veranschaulicht. Dabei ist ebenso zu erkennen, dass drei Lungenkrebspatienten nicht erkannt, dafür aber drei Gesunde fälschlicherweise als krank klassifiziert wurden. Im Vergleich mit der Anwendung von 1-Butanol als univariater Biomarker für die Zuordnung (Abbildung 60, Seite 92) wird durch die LDA die gleiche Sensitivität und eine etwas bessere Spezifität erhalten.

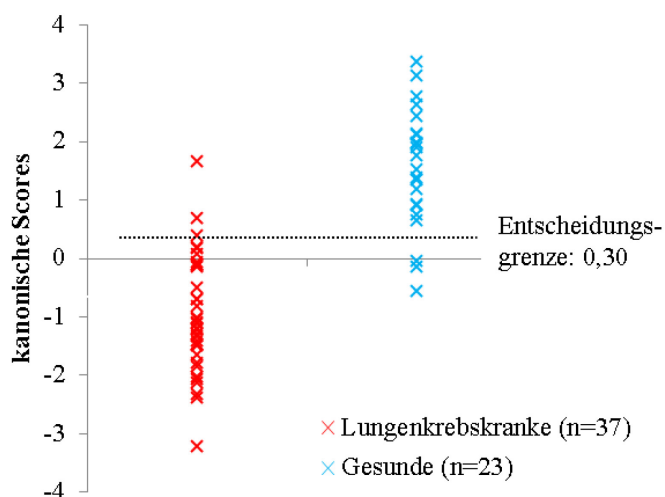


Abbildung 63: Darstellung der Ergebnisse der linearen Diskriminanzanalyse mit 4 Variablen (Ansatz 3)

Ansatz 1 enthält noch die hintergrundbeeinflussten Analyten 3-Methylpentan und Cyclohexan (Anhang Tabelle 48, Seite A-66). Dabei ist der kanonische Faktor für 3-Methylpentan sehr gering, jedoch für Cyclohexan recht groß. Dadurch nimmt der Atemgehalt an Cyclohexan einen starken Einfluss auf die Klassifizierung eines Objektes, so dass eine Zuordnung zu gesund oder krank teilweise auf Basis der Luftzusammensetzung des Probenahmeraums stattzufinden scheint.

Ansatz 2 und 3 enthalten 1-Butanol und 2-Butanon, die bereits bei der univariaten Auswertung als signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Studiengruppen erkannt wurden. Der 2-Pentanongehalt ist ebenfalls Bestandteil beider Modelle, obwohl sich bei der univariaten Auswertung keine signifikante Beeinflussung dieser Substanz durch den Gesundheitszustand zeigte. Buszewski *et al.*

[76] konnten signifikant erhöhte 2-Pentanongehalte in der Atemluft von Lungenkrebskranken im Vergleich zu gesunden Rauchern und Nichtrauchern beobachten. Potentielle endogene Bildungswege im Menschen sind analog zu denen, die bereits für 2-Butanon diskutiert wurden. Andererseits gibt es erste Indizien, dass eine erhöhte 2-Pentanonkonzentration bei beatmungsassoziierter Pneumonie durch Infektion mit *Escherichia coli* auftreten kann [209]. Darüber hinaus produzieren verschiedene Bakterien, die ebenfalls an einer Lungenentzündung beteiligt sein können, *in vitro* ebenso 2-Pentanon [208, 210]. Ferner wurde 2-Pentanon bereits als potentieller Biomarker in Urin für die Detektion von Nierenerkrankungen diskutiert [228].

Die beiden Ansätze 2 und 3 unterscheiden sich in der vierten Variablen: In Ansatz 2 ist n-Dekanal beinhaltet, während es bei Ansatz 3 n-Hexanal ist. Die Substanz n-Dekanal war bereits bei der univariaten Auswertung signifikant im Atem von Lungenkrebskranken erhöht gewesen. Dies traf sowohl bei Betrachtung der gesamten Studienpopulation als auch bei der Auswertung der Untergruppe der Nichtraucher zu. Demgegenüber konnte ein signifikanter Unterschied für die n-Hexanal-konzentration in der Atemluft nur bei Vergleich der Untergruppen lungenkrebskranke Nichtraucher und gesunde Nichtraucher festgestellt werden. Aus messtechnischen Gesichtspunkten ist das Set mit n-Hexanal zu bevorzugen, weil für diese Substanz seltener Koelutionen bei der HS-SPME-GC-MS-Analytik beobachtet wurden (vgl. Anhang Tabelle 39, Seite A-56).

Abschließend sind zwei weitere Punkte zu berücksichtigen: Zum einen setzt die LDA normalverteilte Variablen voraus [145]. Trotz des Logarithmierens wird dieses Kriterium nur für einen Teil der Substanzen erfüllt. Zum anderen war im Rahmen eines Lagerversuches von Standards in Gassammelrohren festgestellt worden (Abbildung 50, Seite 79), dass für einige der Zielanalyten, wie z. B. 1-Butanol und n-Hexanal, bereits bei einer Lagerung von einem Tag eine deutliche Reduktion der Wiederfindung auftrat. Beide Punkte führen zu Unsicherheiten in Bezug auf die Bewertung der abgeleiteten potentiellen Biomarker.

In der Zusammenfassung wurde die LDA erfolgreich eingesetzt, um potentielle Biomarkersets aus den Analysendaten abzuleiten. Dadurch ist eine gute Klassifizierung der Atemluftproben von Gesunden und Lungenkrebskranken möglich. Abschließend sollte noch die hierarchische Clusteranalyse angewendet werden.

Hierarchische Clusteranalyse

Die hierarchische Clusteranalyse nach der Ward-Methode wurde für die vier Analyten des Ansatzes 3 durchgeführt (Abbildung 64). Das Ziel eines solchen Gruppenbildungsverfahrens ist es, ähnliche Objekte zusammenzufassen. Es können drei Hauptcluster beobachtet werden. Der Cluster mit den meisten Objekten enthält hauptsächlich Atemluftproben von Lungenkrebspatienten, während der nächstgrößere Cluster im Wesentlichen Proben von Gesunden enthält. In einem dritten Cluster mit insgesamt nur acht Objekten sind gleichermaßen Atemluftproben von Kranken und Gesunden zusammengefasst. Damit bestätigte sich das Ergebnis der LDA: Eine Unterscheidung von Lungenkrebspatienten und Gesunden auf Basis der Gehalte der vier ausgewählten VOC in Atemluft ist möglich, aber erfolgt nicht zu 100% korrekt. Bei Anwendung der hierarchischen Clusteranalyse auf das anfängliche Set mit 19 Analyten wird eine stärkere Durchmischung der Cluster deutlich (Anhang Abbildung 18, Seite A-66).

Sowohl durch univariate als auch durch multivariate Auswertung konnten potentielle Biomarker für die Lungenkrebserkennung ermittelt werden. Allerdings ist zu beachten, dass in der Studie als Vergleichspopulation Gesunde eingeschlossen wurden. Damit beschreiben die errechneten Modelle nicht zwingend die Zustände gesund und lungenkrebskrank, sondern gegebenenfalls nur gesund und krank. Folglich kann nicht abgeschätzt werden, wie das Modell Atemluftproben von Menschen mit anderen Erkrankungen kategorisieren würde. Einige der abgeleiteten potentiellen Biomarker wurden, wie bereits dargestellt, auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen beschrieben (vgl. Auswahl in

Tabelle 19, ab Seite 95). Andererseits könnte gerade die Kombination mehrerer Variablen in dem multivariaten Ansatz eine erhöhte Spezifität aufweisen.

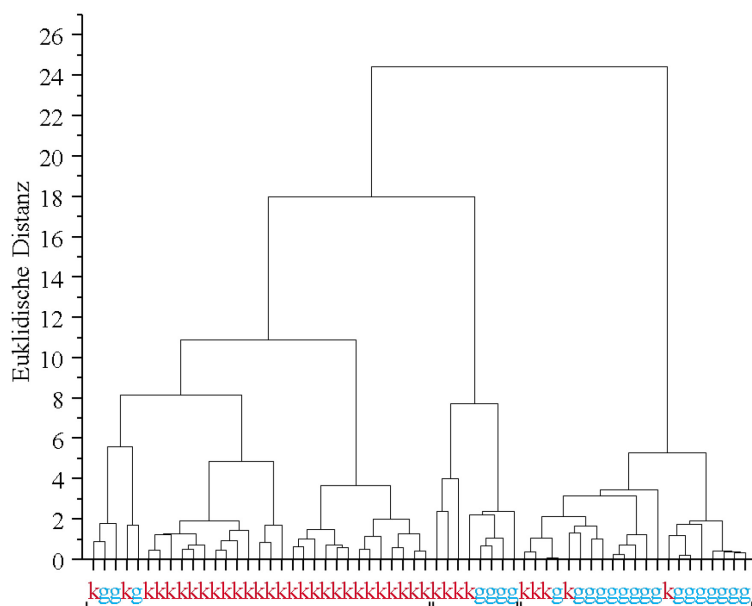


Abbildung 64: Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse nach der Ward-Methode mit 4 Variablen (Ansatz 3); die Klammern kennzeichnen die drei Hauptcluster

k: Lungenkrebskranker, g: Gesunder

Im Weiteren sollen durch die Auswertung weiterer Proben zusätzliche Indizien für die Bewertung der abgeleiteten Biomarkerkandidaten gewonnen werden. Dafür wird mit der Betrachtung der Verlaufsanalysen begonnen.

4.2.7 Auswertung von zusätzlichen Proben

Quantitative Auswertung von Verlaufsanalysen

Es ergab sich die Möglichkeit, bei zwei Patienten drei Monate nach der Tumorresektion erneut die Atemluft zu untersuchen. Dabei war nach der Operation für beide Patienten in der Atemluft eine Absenkung der Aldehydgehalte – mit Ausnahme von Propanal, welches einen Anstieg auf das Siebenfache aufwies – zu beobachten (Tabelle 22); die Ergebnisse für die weiteren Zielsubstanzen sind in Anhang Tabelle 49 (Seite A-67) dargestellt. Es gibt bereits einige wenige Veröffentlichungen zu Verlaufsuntersuchungen des VOC-Profiles von Atemluft von Patienten nach der Lungentumorresektion. Allerdings wird in keiner dieser Publikationen eine Veränderung der Aldehydgehalte beschrieben. Poli *et al.* [66] beobachteten in der Atemluft von fünf Patienten durch die Tumorresektion abgesenkte Gehalte für Isopren und n-Dekan. Broza *et al.* [229] ermittelten für 17 Patienten eine Reduktion der Konzentration von 2-Methyl-1-penten, 2-Hexanon, 3-Heptanon, Styren und 2,2,4-Trimethylhexan in der Atemluft.

Tabelle 22: Vergleich der in der Atemluft analysierten Aldehydgehalte in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ von zwei Lungenkrebspatienten vor Behandlungsbeginn und 3 Monate nach der Tumorresektion (Verlaufskontrolluntersuchungen)

	Verlaufskontroll-Patient 1		Verlaufskontroll-Patient 2	
	vor Behandlungsbeginn	3 Monate nach OP	vor Behandlungsbeginn	3 Monate nach OP
Propanal	40,8	122	n. a.	123
n-Butanal	2,10	n. a.	1,39	0,51
n-Pentanal	1,29	0,28	0,80	0,30
n-Hexanal	3,58	1,40	4,75	1,80
n-Heptanal	0,86	0,15	1,93	n. d.
n-Oktanal	0,96	n. a.	2,67	n. d.
n-Nonanal	6,35	n. d.	9,51	n. d.
n-Dekanal	1,94	n. d.	5,21	n. d.

n. a.: nicht auswertbar, n. d.: nicht detektierbar, n. e.: nicht erfassbar, weil die Auswertung mit der quadratischen Regressionsgerade einen fehlerhaften Ergebnis zurückgibt

Ein Zusammenhang zwischen den veränderten Aldehydgehalten und der Tumorresektion wäre vorstellbar; im Vergleich der Atemluftproben von Lungenkrebskranken zu Gesunden konnten in unserer Studie erhöhte Aldehydgehalte bei den Patienten beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.2.6). Folglich wären diese beiden Proben als zusätzliches Indiz dafür zu betrachten, dass bei einer Lungenkrebserkrankung der Aldehydgehalt in der Atemluft verändert ist. Andererseits könnte hier auch ein Einfluss der chemotherapeutischen Behandlung vorliegen. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Auswertung von nur zwei Proben aufgrund möglicher weiterer Faktoren keine sicheren Aussagen zum Einfluss der Tumorresektion auf das VOC-Profil der Atemluft zulässt.

Im Anschluss werden die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen von Atemluftproben in adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen vorgestellt und dahingehend geprüft, ob sie zusätzliche Informationen für die Bewertung der ermittelten Biomarkerkandidaten bereitstellen.

Qualitative Auswertung des VOC-Profiles von Atemluft in Probenahmeröhrchen

Die von den Studienteilnehmern mit adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen genommenen Atemluftproben wurden ebenfalls mit HS-SPME-GC-MS analysiert, allerdings qualitativ. Alle Probenahmeröhrchen konnten mit ein und derselben Car/PDMS-Faser untersucht werden. Bemühungen, eine Qualitätssicherung durch parallele Analyse von standarddotierten Probenahmeröhrchen zu realisieren und damit eine Basis für die Vergleichbarkeit der Untersuchungen über den Studienzeitraum zu etablieren, scheiterten an der hohen VOC-Grundbelastung der Vliesmaterialien (vgl. Kapitel 3.2.2); durch die Standardeinbringung konnte für die meisten Zielsubstanzen keine Intensitätssteigerung erreicht werden.

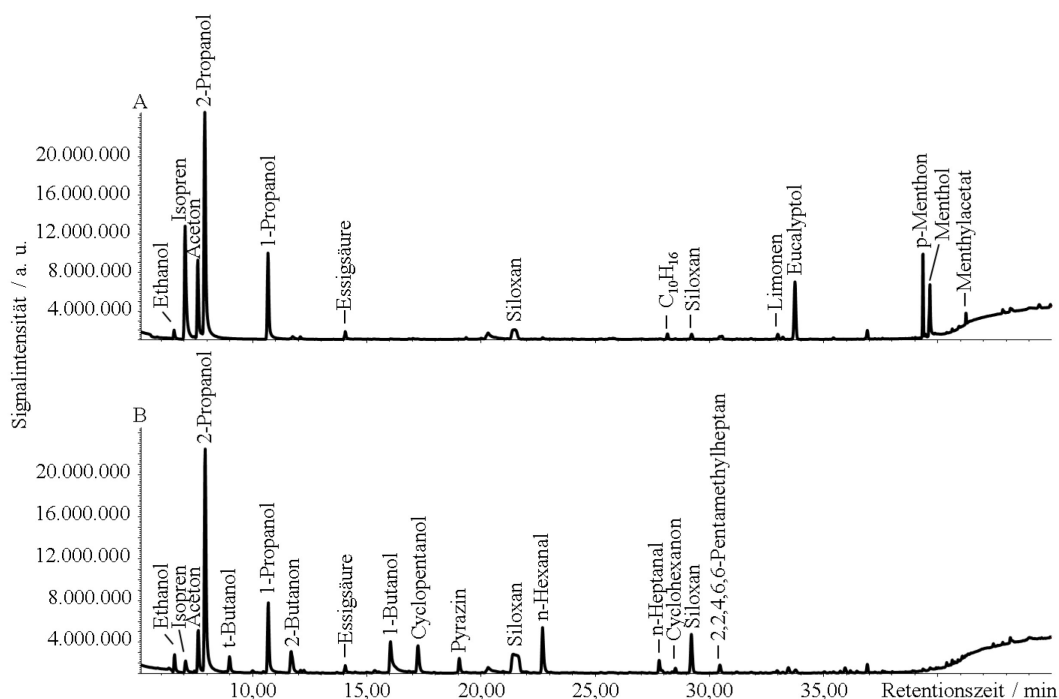


Abbildung 65: Vergleich der HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Atemluftproben eines Lungenkrebskranken genommen mit Gassammelrohr (A) und mit adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen (B).

Abbildung 65 zeigt die HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme der Atemluftproben eines Lungenkrebspatienten in dem Gassammelrohr und dem Probenahmeröhrchen. Viele Signale aus der Probe im Gassammelrohr traten ebenso im Probenahmeröhrchen auf, wie z. B. die Matrixsubstanzen Isopren, Aceton und 2-Propanol. Allerdings sind einige Substanzen, wie z. B. Isopren und Eucalyptol, mit deutlich höheren Signalintensitäten in der Atemluftprobe in dem Gassammelrohr zu beobachten. Für weitere Substanzen, wie n-Hexanal und t-Butanol, sind demgegenüber größere Signale in der Atemluftprobe in dem Probenahmeröhrchen feststellbar. Allerdings handelt es sich dabei auch um

VOC, die bereits im Rahmen der Untersuchungen zur Hintergrundbelastung der Vliese auftraten. Folglich resultieren die erhöhten Signalintensitäten nicht zwangsläufig aus dem Eintrag mit der Atemluft.

Außerdem unterscheiden sich die beiden Atemluftproben in den Verhältnissen der Signalhöhen zueinander. In der Probe im Gassammelrohr ist für Isopren ein intensiveres Signal als für Aceton festzustellen. Dieses Verhältnis wird in der Atemluftprobe im Probenahmeröhrchen nicht widergespiegelt, hier ist das Acetonsignal höher. Folglich ergibt die Untersuchung der Atemluftprobe in dem adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen ein anderes VOC-Profil als die Atemluftprobe in dem Gassammelrohr.

Insgesamt konnten 18 Atemluftproben von Patienten, 23 Proben von Gesunden und 12 unbeatmete Probenahmeröhrchen ausgewertet werden. Von den 24 Ziel-VOC waren sechs Substanzen – 2-Methylpentan, Methylcyclopentan, n-Oktan, n-Pentanal, n-Nonanal und n-Dekanal – in einem Großteil der Chromatogramme aufgrund von Koelution nicht auswertbar. Dabei fiel die Koelution von n-Pentanal mit Cyclopentanol nur bei Betrachtung des kompletten Massenspektrums im Scan-Modus auf, da die in der SIM-Detektion betrachteten Fragmente das gleiche Target-zu-Qualifier-Verhältnis besaßen.

In Abbildung 66 sind die Signalintensitäten für die auswertbaren Ziel-VOC als Mittelwert der einzelnen Probentypen dargestellt. Im Vergleich zu den Blindwerten konnten für die Atemluftproben der Patienten im Mittel ähnliche oder höhere Signalintensitäten beobachtet werden, während bei den gesunden Probanden größtenteils niedrigere durchschnittliche Signalintensitäten zu erkennen waren.

In Anhang Tabelle 50 (Seite A-67) sind die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für diese 18 Zielsubstanzen aufgeführt. Dabei kann zwischen unbeatmeten Probenahmeröhrchen und Atemluftproben von Lungenkrebspatienten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, während die Atemluftproben der Gesunden signifikant niedrigere Signalintensitäten für nahezu alle betrachteten VOC aufwiesen.

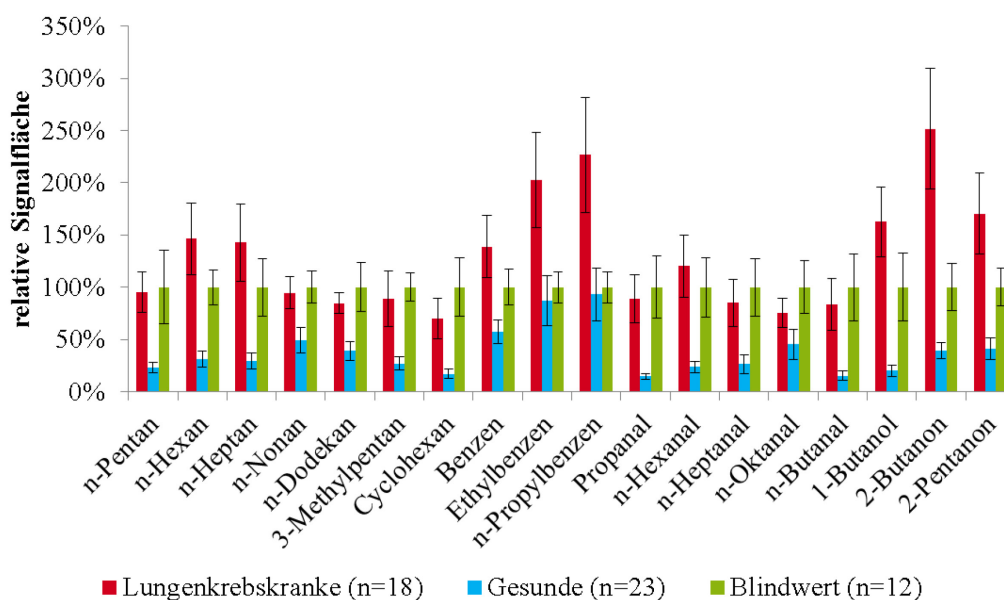


Abbildung 66: Vergleich der Signalflächen der auswertbaren Ziel-VOC bestimmt mit HS-SPME-GC-MS in Atemluftproben von Lungenkrebskranken und Gesunden in Probenahmeröhrchen mit unbeatmeten Probenahmeröhrchen (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes); Normierung erfolgte auf den Mittelwert der Blindwertproben

Eine mögliche Erklärung ist, dass mit der Atemluft Feuchtigkeit in die Proben eingetragen wurde, so dass sich die Matrix der beatmeten Röhrchen von den unbeatmeten unterschied; ein Feuchtigkeitseffekt hätte sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die VOC-Verteilung während der SPME. Unter diesen Umständen wären die Analysenergebnisse der Blindwerte und der Atemluftproben nicht vergleichbar; die Vergleichbarkeit kann nur für die Atemluftproben untereinander angenommen werden. In diesem

Fall würden die Lungenkrebskranken mit der Atemluft signifikant mehr von den Zielsubstanzen in die Probenahmeröhrchen eintragen als die Gesunden. Auch bei den Atemluftproben in Gassammelrohren wurden, falls signifikante Unterschiede bestanden, höhere VOC-Gehalte für die Patienten ermittelt als für die Gesunden; allerdings waren in den Proben im Gassammelrohr nur einige wenige der Zielsubstanzen signifikant verändert, während in den Probenahmeröhrchen für alle auswertbaren VOC Unterschiede beobachtet werden konnten. Einzige Ausnahme bestand für die Zielsubstanz Cyclohexan, die in den Atemluftproben der Gesunden in Gassammelrohren mit höheren Konzentrationen festgestellt wurde; dieses Ergebnis kann durch die Analyse der Probenahmeröhrchen ebenfalls nicht bestätigt werden.

Zu einem Zeitpunkt konnten Atemluftproben in Gassammelrohren und in Probenahmeröhrchen von drei Patienten analysiert werden, so dass eine Vergleichbarkeit der Analysenwerte für die Probenahmeröhrchen untereinander auch ohne Qualitätskontrollanalyse angenommen werden kann.

Im Vergleich der Atemluftproben, die mit Gassammelrohren genommen wurden, und der Proben in Probenahmeröhrchen (Abbildung 67) wird ein Widerspruch zu den Ergebnissen zur Adsorptionsfähigkeit der Vliese (vgl. Abbildung 25, Seite 39) deutlich. Obwohl für Patient A der höchste Propanalgehalt in der Probe im Gassammelrohr bestimmt wurde, ist die Signalintensität im beatmeten Probenahmeröhrchen niedriger als in den beatmeten Probenahmeröhrchen der anderen beiden Patienten. Demgegenüber wurde in dem Modellversuch zur Adsorptionsfähigkeit eine gute Retention für Propanal beobachtet. Der erhöhte Benzengehalt in der Atemluft von Patient C spiegelt sich im beatmeten Probenahmeröhrchen im Vergleich zu den beiden anderen Patienten wieder, obwohl im Modellversuch keine Retention für diese Substanz festgestellt wurde. Diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, dass beim Modellversuch zum Überspülen des Inhalts des Gassammelrohres mit 1 L Modellattem 30 min angewendet wurden, während beim regulären Beatmen des Probenahmeröhrchens mit einem Atemstoß nur ca. 20 s notwendig waren. In der Konsequenz war der durchgeführte Modellversuch nicht geeignet, um die Adsorptionsfähigkeit der Vliese zu charakterisieren, da er die realen Bedingungen nicht ausreichend widerspiegelt.

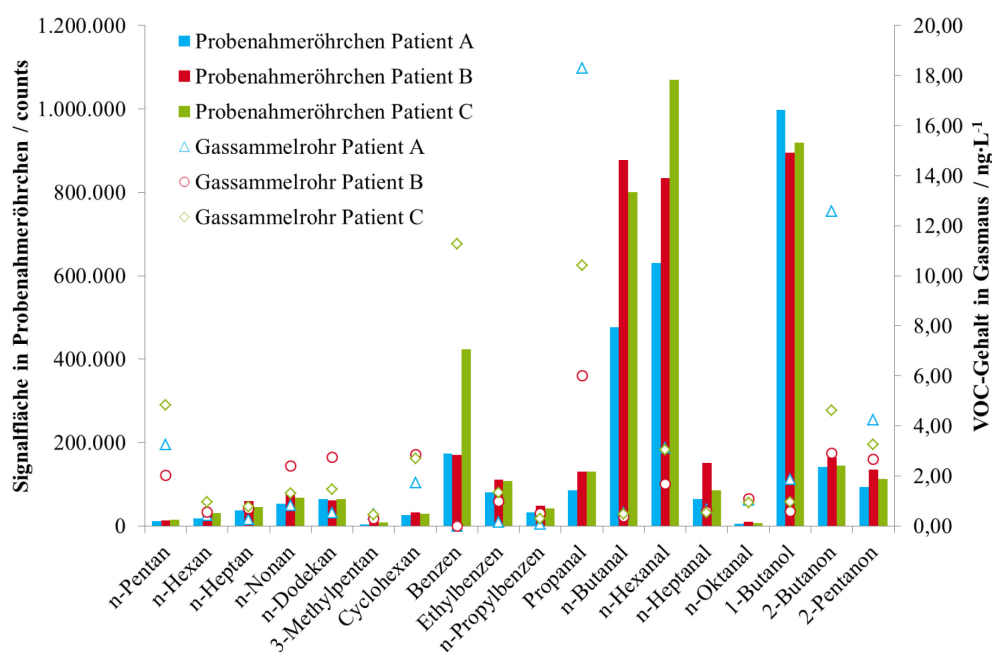


Abbildung 67: Vergleich der VOC-Profile von Atemluftproben dreier Lungenkrebspatienten in Probenahmeröhrchen (Balken) und Gassammelrohr (Symbole) analysiert mit HS-SPME-GC-MS

Durch die – allerdings nur eingeschränkt vergleichbaren – Untersuchungen der Atemluftproben in adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den

Proben von Gesunden und Erkrankten beobachtet werden, obwohl für die Vliese eine deutliche Hintergrundbelastung bestand. Inwiefern dieser Unterschied ursächlich dafür ist, dass Hunde Atemluftproben von Lungenkrebspatienten erkennen können [169], kann mit dieser Untersuchung nicht geklärt werden. Gegebenenfalls sind die hier untersuchten Zielsubstanzen für die Geruchserkennung der Hunde relevant. Vielleicht sind es aber auch andere Stoffe, die aufgrund eines zu unempfindlichen Analyseverfahrens nicht erfasst werden können. Für n-Amylacetat erfolgt für Hunde die Angabe einer Geruchsschwelle von unter 2 ppt (entspricht ca. $0,01 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) [230], während mit dem hier eingesetzten Analysenverfahren nur für eine der 24 ausgewählten Zielsubstanzen, nämlich n-Propylbenzen, eine entsprechend niedrige Nachweisgrenze bei Analyse von Atemluftproben in den Gassammelrohren erreicht werden konnte (vgl. Tabelle 16, Seite 78). Darüber hinaus sind mit der gewählten Analyse-methode nur ausreichend thermostabile VOC erfassbar, so dass thermolabile Substanzen, die durchaus geruchsaktiv sein können, grundsätzlich mithilfe der GC-Analytik nicht zugänglich sind.

Insgesamt sind die Untersuchungen des VOC-Profiles der Probenahmeröhrchen nur mit einem geringen Erkenntnisgewinn verbunden gewesen. Der prinzipielle Unterschied in der VOC-Zusammensetzung der Atemluft von Lungenkrebskranken und Gesunden wurde bestätigt; dabei ist allerdings die eingeschränkte Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse über den Studienzeitraum zu berücksichtigen. Darüber hinaus bestand nur eine geringe Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen der Gassammelrohre, so dass sich hier keine zusätzlichen Informationen zur Bewertung der abgeleiteten Biomarkerkandidaten ergaben.

Als nächstes werden die Ergebnisse zur qualitativen VOC-Untersuchung von Lungengewebe vorgestellt.

Qualitative Untersuchung des VOC-Profiles von reseziertem Lungengewebe

Einige der Lungenkrebspatienten wurden im Rahmen ihrer regulären Behandlung in den Kliniken operiert, um das Tumorgewebe vollständig zu entfernen. Bei fünf Patienten eröffnete sich die Gelegenheit, reseziertes Tumorgewebe und zum Vergleich pathologisch unauffälliges Lungengewebe mit HS-SPME-GC-MS zu untersuchen.

Die Chromatogramme der Gewebeproben wurden für die 24 Zielsubstanzen ausgewertet. Durch Vergleich der Signalflächen von Tumorgewebe und unauffälligem Gewebe war für keine der Ziel-VOC ein einheitlicher Trend für alle fünf Probenpaare ablesbar (Anhang Tabelle 52, Seite A-70). Auch durch Korrektur der Signalflächen auf die Probeneinwaage und auf Standardvergleichsuntersuchungen ergab sich für keine der betrachteten Substanzen eine Erhöhung oder Erniedrigung im Tumorgewebe für alle fünf Patienten. Dem gegenüber wurden in der Literatur durchaus signifikante Trends unter anderem auch für einige der hier untersuchten Zielsubstanzen beschrieben: So konnten Buszewski *et al.* [53] erhöhte 2- und 3-Methylpentan- sowie 2-Butanon- und 2-Pentanongehalte in Lungenkrebsgewebe gegenüber gesundem Gewebe nachweisen. Filipiak *et al.* [20] konnten unter anderem für n-Oktan signifikant erhöhte Gehalte in pathologisch auffälligem Gewebe feststellen. Poli *et al.* [159] beobachteten erhöhte Gehalte an aromatischen Verbindungen in Tumorgewebe.

Für die Gewebeuntersuchungen stand nur eine geringe Anzahl an Proben zur Verfügung und die Einwaage an gesundem und pathologischem Lungengewebe variierte stark (vgl. Tabelle 13, Seite 61), was den Vergleich und damit die Ableitung eines allgemeinen Trends erschwerte. Unterschiede in der Größe der Gewebeproben ergaben sich unter anderem aus der Größe des entnommenen Tumors. Auch bei optisch gleich großen Gewebestücken für einen Patienten resultierten unterschiedliche Einwaagen, da sich sehr wahrscheinlich die Dichte von gesundem Lungengewebe und Tumor unterschieden. Darüber hinaus werden bei Anwendung der SPME-Technik die Ergebnisse nicht nur von der absoluten Einwaage beeinflusst, sondern auch von der für die Extraktion zur Verfügung stehenden Oberfläche, so dass der Bezug auf die Einwaage allein für eine Korrektur nicht ausreichend ist. Außerdem wird die SPME auch davon beeinflusst, wie die Diffusion von Substanzen aus dem Inneren

der Probe an die Oberfläche abläuft, was wiederum von der Gewebestruktur abhängen dürfte. Folglich sollte das Probenahmeprotokoll für gegebenenfalls zukünftige Untersuchungen in einer Weise abgewandelt werden, die vergleichbare Probeneigenschaften hinsichtlich Einwaage, Oberfläche und Struktur gewährleistet. Dafür könnte eine Zerkleinerung des Gewebes („Aufschluss“) dienlich sein, wobei durch eine parallele Kühlung einer Nekrotisierung und Denaturierung des Materials sowie Verlusten an leichtflüchtigen Molekülen vorgebeugt werden sollte. Falls möglich, könnte auch unter Schutzatmosphäre gearbeitet werden, um Oxidationsvorgänge auszuschließen. Anschließend könnte durch Herstellung einer Suspension aus einer definierten Menge zerkleinertem Gewebe und einem definierten Volumen einer Salz- oder Pufferlösung, welche die Diffusion leichtflüchtiger polarer Moleküle in den Gasraum unterstützt [131], eine einheitliche Probenmatrix für die SPME erzeugt werden. Damit wird jedoch der Aufwand für die Untersuchungen erhöht und es ist fraglich, inwiefern das in den Kliniken vor Ort durchführbar wäre.

Neben der Auswertung der Analysendaten für die Zielsubstanzen wurde auch eine qualitative Auswertung der Scan-Chromatogramme vorgenommen. Dadurch konnten weitere VOC, wie zusätzliche Alkane und Alkohole, Disulfide, stickstoffhaltige Spezies sowie viele weitere, nicht identifizierbare Substanzen, betrachtet werden (Anhang Tabelle 54, Seite A-71). In einigen Gewebeproben erfolgte auch die Identifizierung von chlorhaltigen Spezies, die allerdings nicht durch Vergleich mit authentischen Standardsubstanzen verifiziert wurden. In allen Proben konnte Propofol identifiziert werden, welches ein gebräuchliches Anästhetikum ist [231]; es gibt bereits erste grundlegende Untersuchungen, um zu prüfen, ob das Propofolniveau eines anästhesierten Patienten ergänzend mit Atemluftanalytik überwacht werden kann [232]. Interessant ist, dass bei allen fünf Patienten γ -Butyrolakton (GBL) im gesunden Gewebe deutlich höhere Signalintensitäten aufwies als im Tumorgewebe (Abbildung 68 und Anhang Tabelle 53, Seite A-70). GBL kommt durchaus natürlich in einigen Lebensmitteln vor, wird aber vor allem industriell als Lösungsmittel und Syntheseeadditiv eingesetzt [233]. Ein Nachweis in Atemluft erfolgte bereits [33]. Bekannt ist auch der missbräuchliche Konsum von GBL, da es zu γ -Hydroxybuttersäure (GHB) hydrolysiert wird; die Halbwertszeit der Umsetzung von GBL zu GHB liegt unter 1 Minute [234].

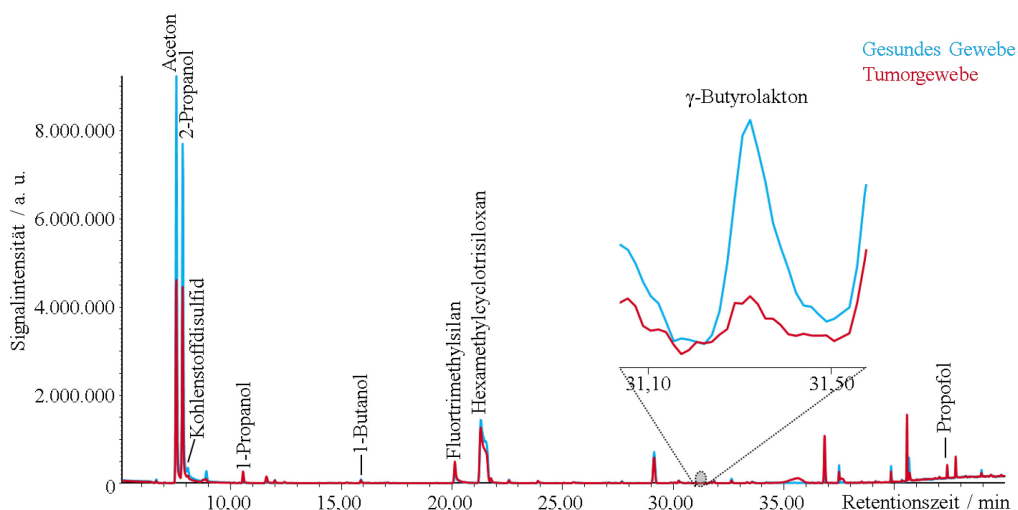


Abbildung 68: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von gesundem Lungengewebe und Tumorgewebe eines Patienten; für γ -Butyrolakton konnte im gesunden Gewebe eine höhere Signalintensität beobachtet werden

Aufgrund der eingesetzten Analysenmethode ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der im MS erfassten Substanz um GBL handelt: die Peakform weist nicht auf die für die verwendete Säule typische Signalform von Säuren hin, welche sich durch eine Signalverbreiterung mit starkem Tailing auszeichnen. Andererseits sollte die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass es aufgrund der hohen Injektortemperatur von 280 °C zu einer Dehydratisierung von GHB kommen könnte, wodurch GBL als Artefakt gebildet werden würde. Demnach könnte es sich bei dem detektierten Signal auch um

einen Summenwert aus GBL und GHB handeln oder ausschließlich um während der Analyse umgesetztes GHB. Dies wäre plausibel, weil eine endogene Bildung von GHB, im Gegensatz zu der von GBL, belegt ist [234]. Eine Überprüfung dieser These war nicht möglich, da GHB als Standardsubstanz nicht frei verfügbar ist. Der Unterschied in den Signalintensitäten für das gesunde Lungengewebe und das Tumorgewebe könnte darin begründet sein, dass möglicherweise GBL/GHB durch die Tumorzellen deutlich schneller metabolisiert wird als in gesundem Gewebe.

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchung von Tumorgewebe zwar ein sehr interessantes Phänomen beobachtet werden, jedoch aufgrund methodischer Grenzen keine zusätzlich Grundlage für die Bewertung der abgeleiteten Biomarkerkandidaten erschlossen werden. Nachdem nun die VOC-Profile sowohl von Zellkulturen als *in-vitro*-Modellsystem als auch von realen Proben vorlagen, soll die Vergleichbarkeit der Ergebnisse geprüft werden.

4.3 Vergleich des Zellkulturmodells mit den Realproben

Da nun sowohl Analysenergebnisse für die verschiedenen Modellproben als auch für reale Atemluft vorlagen, sollten abschließend die Resultate miteinander verglichen werden. Diese Gegenüberstellung erfolgte im Weiteren für das Gasmodell und das Zellkulturmodell.

Vergleich des Gasmodells mit realer Atemluft

Die untersuchten realen Atemluftproben und Gasmodellproben hatten viele Gemeinsamkeiten. So wiesen beide Probentypen ein Volumen von 1 L auf. Sie waren hauptsächlich gasförmig, enthielten aber auch einen geringen Feuchtigkeitsniederschlag an der Glasinnenwandung. Im Fall des Modells bestand dieser Niederschlag aus Wasser sowie aus Methanol aus der zugesetzten Standardlösung, während bei realen Atemluftproben Atemkondensat vorlag, welches neben Wasser auch eine Aerosolfraction enthielt; die Aerosolfraction besteht hauptsächlich aus extrazellulärer Flüssigkeit aus der Epithelschicht der Atemwege und enthält z. B. auch S-Nitrosothiole und Arachidonsäuremetaboliten wie Isoprostane und Leukotriene [235]. Diese Substanzen wurden mit der angewandten HS-SPME-Methode nicht erfasst.

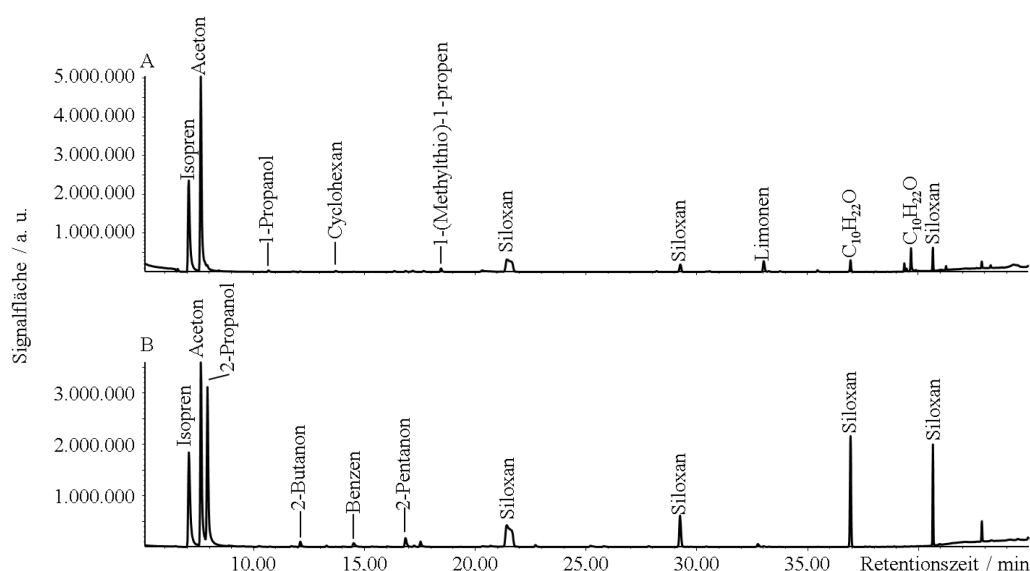


Abbildung 69: Vergleich der HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von realer Atemluft eines Gesunden und Gasmodell; A: Atemluftprobe eines Gesunden, B: Gasmodell aus standarddotierter feuchter synthetischer Luft; Siloxane stammen aus der Car/PDMS-Faser

Beide Probentypen wurden unter Anwendung der gleichen Analysenparameter untersucht. In Abbildung 69 sind die Chromatogramme einer realen Atemluftprobe eines Gesunden und des Gas-

modells mit dotierter Standardlösung (siehe Tabelle 8 Konzentrationsniveau 6, Seite 31) vergleichend dargestellt.

Für zwei der drei Matrixsubstanzen ergaben sich sowohl in der realen Atemluftprobe als auch in dem Gasmodell sehr intensive Signale. Demgegenüber konnte die dritte Matrixsubstanz – 2-Propanol – nur im Gasmodell beobachtet werden, nicht aber in der Atemluftprobe. Das lag daran, dass dieser gesunde Proband die Atemluftprobe in einem nicht mit Desinfektionsmitteln belasteten Raum gespendet hatte. Des Weiteren konnte in der realen Atemluftprobe Cyclohexan nachgewiesen werden, welches als Ziel-VOC auch in dem Gasmodell vorhanden war. Weitere Zielsubstanzen wurden aufgrund niedriger Gehalte in der realen Atemluftprobe erst durch Betrachtung der SIM-Chromatogramme ersichtlich (hier nicht dargestellt).

Darüber hinaus konnten in der realen Atemluftprobe weitere VOC identifiziert werden, die keine Zielsubstanzen waren und deswegen auch nicht in das Gasmodell eingebracht wurden: 1-(Methylthio)-1-propen ist mit der Aufnahme von Lebensmitteln assoziiert [119], während Limonen und die oxidierten Monoterpene mit der Summenformel $C_{10}H_{22}O$ typische Aromastoffe darstellen, deren Eintrag z. B. auf die Verwendung von Mundpflegemitteln zurückgehen kann [236].

Vergleich des Zellkulturmodells mit realer Atemluft

Für den zweiten Vergleich wurde als Realprobe die Atemluftprobe eines Lungenkrebskranken verwendet, während für das Zellkulturmodell Chromatogramme der Lu7387-Zelllinie herangezogen wurden. Von den Zellen erfolgte die Betrachtung des mit *in-situ*-SPME analysierten VOC-Profiles als auch des VOC-Profiles der separierten Zellkulturluft in der Teilprobe Gas.

Unabhängig von dem Probenahmeverfahren konnte dabei zunächst ein theoretischer Vergleich der Bedingungen einer Zellkultur unter Standardbedingungen mit dem Tumorgewebe durchgeführt werden: Bei dem angewendeten Zellkulturverfahren wurde die Anzucht mit hyperoxischen Wachstumsbedingungen durchgeführt, bei dem die Zellen einen vergleichweisen uneingeschränkten Zugang zu den im Kulturmedium enthaltenen Nährstoffen hatten. In Tumorgewebe hingegen trat ein Sauerstoff- und Nährstoffgradient in Abhängigkeit der Entfernung der einzelnen Zelle von den versorgenden Blutgefäßen auf, der zunächst zu hypoxischen und weiter zu anoxischen Bedingungen in der einzelnen Zelle führte [89, 237, 238]. Andererseits war ein Einfluss der Sauerstoff- und Nährstoffverfügbarkeit auf die Stoffwechselvorgänge der Tumorzelle zu erwarten. Ein weiterer potentieller Einflussfaktor auf das resultierende VOC-Profil ist das Mikromilieu der Zellen, welches sich zwischen den hier untersuchten Zellkulturen und realem Tumorgewebe unterschied; bei der Untersuchung an einer Plattenepithelkarzinomzelllinie sind in der Literatur Differenzen in der Menge des gebildeten Acetaldehyds in Abhängigkeit der Wachstumsstruktur – konventionell zweidimensional in Zellkulturflasche oder dreidimensional in einem Hydrogelgerüst – beschrieben [105]. Ferner gibt es in realen Tumoren Signalkaskaden, heterogene Zell-Zell-Kontakte, Wachstumsfaktoren und Cytokine, die durch das *in-vitro*-Modell nicht abgebildet wurden [237].

Für den weiteren Vergleich kann als nächstes die Probenbeschaffenheit herangezogen werden. Es handelte sich sowohl bei der Teilprobe Gas aus der Zellkultur als auch bei der Atemluftprobe um gasförmige Proben. Die Feuchtigkeit im Atem zeigte sich bei der Probenahme mit dem Gassammelrohr als Niederschlag an der Innenseite der Glaswandung. In der Zellkultur lag ebenso eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 90% vor; diese wurde jedoch nicht in die Analysenprobe transferiert; bei der Probenahme der Gasteilprobe bildete sich der Feuchtigkeitsniederschlag bereits in der Glasspritze, mit der die Zellkulturluft aus der Zellkulturflasche in das Vial transportiert wurde. Bei Anwendung der *in-situ*-SPME waren neben der Luft zusätzlich Nährmedium und Zellen in der Probe enthalten. Ein sehr deutlicher Unterschied ergibt sich für die untersuchte Probenmenge: Von der Atemluftprobe stand 1 L zur Verfügung, während die Teilprobe Gas nur 15 mL Zellkulturluft enthielt, die zusätzlich noch

mit der Restluft in dem Vial verdünnt wurde. Die Zellkulturflasche fasste demgegenüber insgesamt ca. 750 mL, die sich auf die Gasphase, 25 mL Nährmedium und die Zellschicht aufteilten.

Bezugnehmend auf die Analyse wurde sowohl die SPME der Atemluftprobe als auch der Teilprobe Gas aus der Zellkultur mit einer Car/PDMS-Faser für eine Extraktionszeit von 60 min durchgeführt, während die *in-situ*-SPME für 15 min erfolgte. Allerdings ergibt sich ein Unterschied bei der Extraktionstemperatur, da die Extraktion der realen Atemluftprobe bei Raumtemperatur erfolgte, während die Zellkulturproben für die Extraktion auf 37 °C temperiert wurden.

In Abbildung 70 sind die HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme einer Atemluftprobe eines Lungenkrebskranken, der *in-situ*-SPME und der Teilprobe Gas aus einer Lu7387-Zellkultur dargestellt. Die Chromatogramme der beiden Modellproben waren zueinander im Hinblick auf die Dominanz von Alkanen und Aromaten sehr ähnlich, unterschieden sich jedoch deutlich zu der Realprobe. Isopren konnte nur in der Atemluftprobe beobachtet werden. Ferner waren exklusiv in der Realprobe Aromastoffe – Limonen, Eucalyptol, p-Menthol, Menthol – nachweisbar, die z. B. mit der Verwendung von Zahnpasta und dem Konsum von Mitteln zur Behandlung von Atemwegserkrankungen, wie Lutschbonbons, assoziiert sein können [236]. Die Alkohole Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol und das Keton Aceton konnten sowohl in der Realprobe als auch in den Zellkulturmodellproben nachgewiesen werden, allerdings mit unterschiedlichen Signalflächenverhältnissen zueinander. Die Substanz n-Oktan wurde in den Zellkulturproben mit einer relativ hohen Signalintensität beobachtet, was mit der Hintergrundbelastung der Einwegzellkulturflasche (vgl. Kapitel 4.1.1) in Zusammenhang stehen dürfte und folglich auf einen exogenen Ursprung zurückzuführen ist. Andererseits beobachteten Filipiak *et al.* [20] erhöhte n-Oktangehalte sowohl in der Atemluft von Lungenkrebspatienten als auch in reseziertem Tumorgewebe im Vergleich zu Kontrollproben und verwiesen auf die in anderen Studien beobachtete Erhöhung im Zellkulturmodell. Die Substanz n-Oktan konnte auch in den hier untersuchten Atemluftproben detektiert werden, allerdings nur bei Anwendung der SIM-Technik.

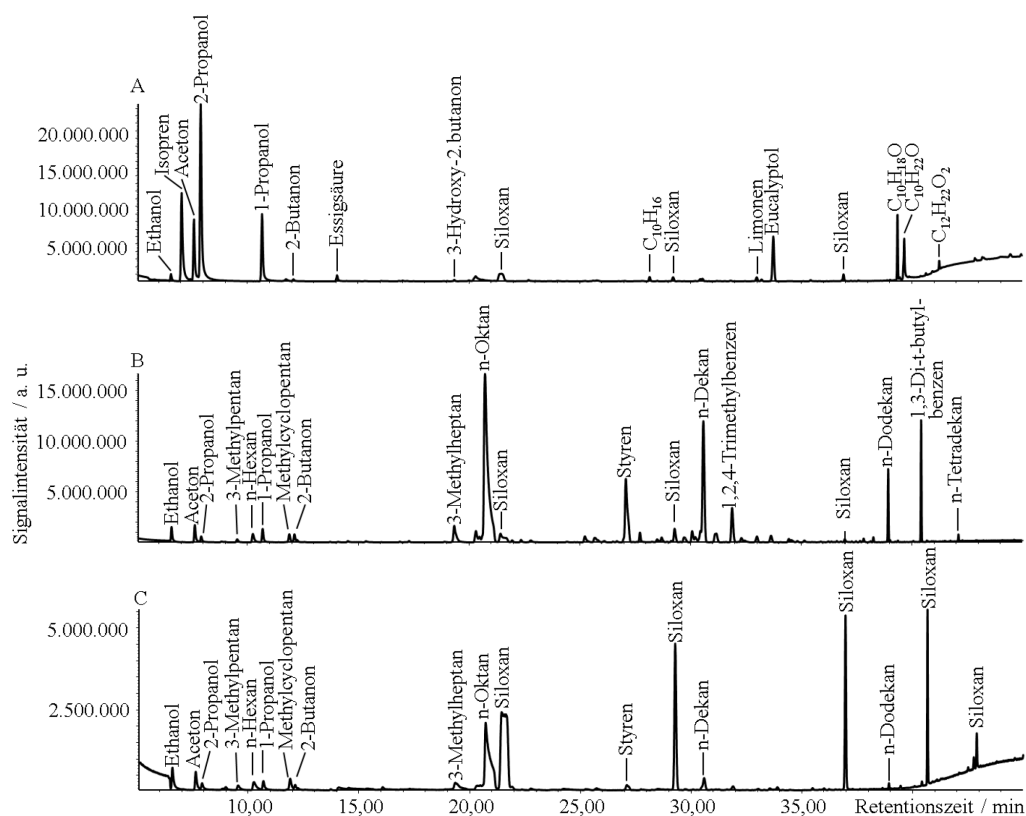


Abbildung 70: Vergleich der HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von realer Atemluft eines Kranken und Zellmodell; A: Atemluftprobe eines Lungenkrebskranken, B: *in-situ*-SPME der Lungenkrebszelllinie Lu7387, C: Teilprobe Gas der Lungenkrebszelllinie Lu7387; Siloxane stammen aus der Car/PDMS-Faser

Im Vergleich der ermittelten signifikanten Unterschiede im VOC-Profil von Atemluftproben von Lungenkrebskranken und Gesunden (vgl. Kapitel 4.1) und Lu7387-Zellen mit zellfreiem Nährmedium (vgl. Kapitel 4.2) waren nur wenige Übereinstimmungen feststellbar. Ethylbenzen war in der jeweiligen positiven Probe gegenüber der Kontrollprobe erhöht. Allerdings ist kein endogener Bildungsmechanismus für diesen Aromaten bekannt und ein exogener Eintrag durch Rauchen und Abgase [239] bei den Realproben bzw. durch die Einwegkulturflaschen im Fall der Modellproben wahrscheinlicher. Die beobachteten erhöhten Gehalte einiger Aldehyde in den Atemluftproben der Lungenkrebspatienten im Vergleich zu den Gesunden konnte im Modell nicht nachvollzogen werden; hier fand eine Reduktion der Aldehyde durch die Lungenadenokarzinomzellen statt. Diese Diskrepanz wurde auch bereits durch Kalluri *et al.* [89] herausgestellt. Auch konnten die erhöhten Gehalte von 1-Butanol und 2-Butanon, die in den Atemluftproben von Lungenkrebspatienten festgestellt wurden, im Zellkulturmodell nur bei der A549-Zelllinie, nicht aber bei den beiden anderen Zelllinien beobachtet werden.

Zusammengefasst konnten für reale Atemluftproben einige Übereinstimmungen mit dem Gasmodell belegt werden, während im Vergleich mit dem Zellkulturmodell nur wenige Gemeinsamkeiten vorlagen. Folglich ist zu bezweifeln, dass die Untersuchung von Zellkulturen unter den in dieser Arbeit angewendeten Bedingungen für die Suche nach Biomarkern in der Atemluft zur Lungenkrebserkennung vielversprechend ist.

Neben den dargestellten Experimenten und Ergebnissen an Gasmodellen, Zellkulturen und realen Atemluftproben zur Ableitung von Biomarkerkandidaten für die Lungenkrebserkennung wurden noch weitere Teilprojekte im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet. Eine kurze Ergebnisdarstellung dazu findet sich im nächsten Kapitel.

4.4 Weitere Ergebnisse

In-vitro-Zellmodell im Hunde- und Bienengeruchstest

Die Zellkulturen wurden nicht nur mit HS-SPME-GC-MS hinsichtlich ihres VOC-Profiles untersucht. Zusätzlich erfolgte auch der Test, ob Hunde und Bienen darauf trainiert werden können, Zellkulturproben von zellfreien Mediumproben zu unterscheiden. Die entsprechenden Versuche sind bereits veröffentlicht. Zwei Hunde erreichten bei einem doppelblinden Test mit zehn Trials, bei dem sie jeweils eine Zellkulturprobe und drei zellfreie Nährmediumproben – jeweils HS in Probennehmeröhrchen – präsentiert bekamen, Sensitivitäten von 10 und 20 % sowie Spezifitäten von 50 bzw. 40 %. Von 14 Bienen, die differentiell – mit HS aus den Kulturflaschen in Einwegspritzen – konditioniert worden waren, zeigten jeweils 13 Bienen Zellkulturproben und zellfreie Mediumproben gleichermaßen als positiv an. Insgesamt konnte also mit keiner der beiden Tierspezies eine Unterscheidung der Proben typen erreicht werden.

Die im Test mit den Hunden ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten waren ernüchternd niedrig und unterschieden sich nicht von denen eines Zufallsergebnisses. Im Gegensatz zu den hier berichteten Ergebnissen konnten Yoel *et al.* [240] zwei Spürhunde erfolgreich mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% darauf trainieren, Zellkulturen einer Brustkrebszelllinie von zellfreiem Kulturmedium als auch von Zellkulturen mit einer nicht-malignen Keratinozytenzelllinie zu unterscheiden. Darüber hinaus indizierten diese Hunde anschließend auch Kulturen der A549-Lungenkrebszelllinie und einer Melanomzelllinie, ohne dass sie speziell auf diese Zelllinien trainiert worden waren [240]. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass bei der Studie von Yoel *et al.* [240] die Hunde mit den kompletten Zellkulturen trainiert worden waren und nicht, wie in unseren Versuchen, mit auf einem Trägermedium aufgebrachter Zellkulturluft, bei dem deutlich geringere Substanzkonzentrationen zu erwarten sind. Darüber hinaus könnten auch Unterschiede im Hundetraining zwischen den beiden Studien ursächlich sein; dies kann jedoch nicht bewertet werden, da in der zitierten Studie zwar ein allgemeines Trainingsprinzip beschrieben wird, jedoch Details, wie z. B. Dauer des Trainings oder Anzahl der Trainingsproben, nicht angegeben sind.

Für Fruchtfiegen konnte gezeigt werden, dass auf der neuronalen Ebene auf der Antenne die Luft über kultivierten Brustkrebszellen und gesunden Zellen unterschiedlich codiert wird [241]. Auf der Verhaltensebene zeigten Honigbienen in unseren Versuchen zur Diskriminierung von Gasraum aus Lungenkrebszellkulturen hingegen eine starke Generalisierung für eine Zellkultur einer AC-Zelllinie und dem Nährmedium. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Honigbienen die Gerüche auf neuronaler Ebene ebenso wie die Fruchtfiegen codieren, lässt sich vermuten, dass die Salienz der sich zwischen den Proben unterscheidenden Komponenten (z. B. Aldehyde) geringer ist als die von den gleichermaßen auftretenden Substanzen (z. B. Ketone) und es deswegen zu einer Generalisierung der beiden Düfte auf Verhaltensebene kam.

Untersuchung der Eignung von Kräutermischungen als Geruchsreferenzmaterialien

Nachdem das Geruchstraining mit den Proben aus Lungenkrebszellkulturen nicht erfolgreich gewesen war, wurde mit eigens hergestellten Geruchsreferenzmaterialien auf Kräuterbasis geprüft, inwiefern Hunde und Bienen in der Lage sind, das von ihnen geforderte Lernkonzept umzusetzen. Eine begleitende instrumentelle Analytik diente der Charakterisierung der Referenzmaterialien.

Die Geruchsreferenzmaterialien bestanden aus bis zu sechs Kräutern in unterschiedlicher Zusammensetzung und wurden entweder mit oder ohne Kamille als Zielkomponente hergestellt. Im VOC-Profil analysiert mit HS-SPME-GC-MS konnten u. a. Artemisiaketon und 2-Methylbuttersäureethylester als spezifische Substanzen für Kamille nachgewiesen werden (Abbildung 71); dabei kamen veränderte Methodenparameter zur Anwendung, die hier nicht näher angegeben sind.

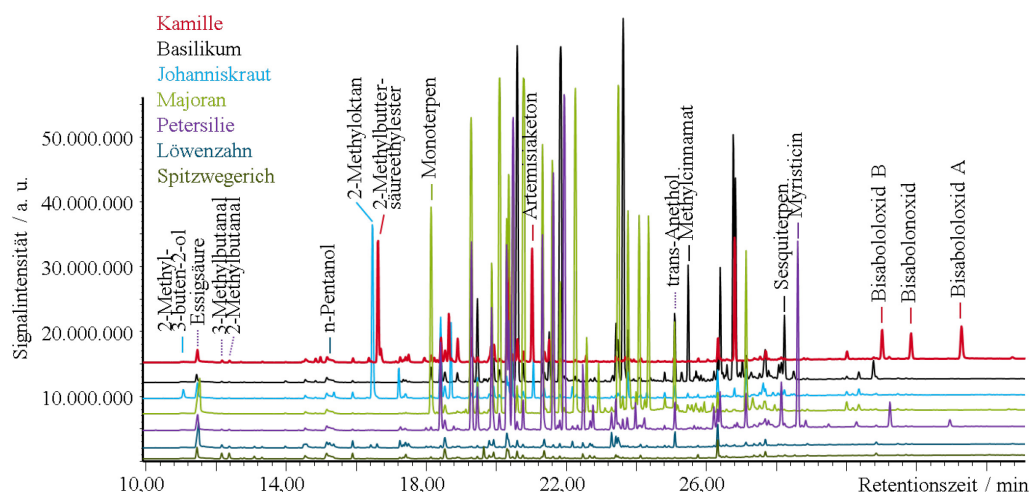


Abbildung 71: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme verschiedener, getrockneter Kräuter

Die analytische Charakterisierung der Geruchsreferenzmaterialien mit HS-SPME-GC-MS zeigte eine weitgehende Homogenität der hergestellten Kräutermischungen in Bezug auf das VOC-Profil. Bei einer Lagerung im Dunkeln bis zu 12 Wochen bei 40 °C traten Veränderungen im VOC-Profil auf, die bei einer analogen Lagerung bei Raumtemperatur weniger ausgeprägt waren. Die Lagerung der Materialien bei 4 °C war mit den geringsten Veränderungen verbunden. Für die 11 betrachteten Substanzen (Aldehyde, Ester, ungesättigtes Keton, Terpene, oxidiert Terpene) konnte ein unterschiedliches Verhalten während der Lagerung beobachtet werden. So wurde z. B. für 3-Methylbutanal eine Neubildung bei Raumtemperatur und verstärkt bei 40 °C ermittelt, die für n-Pentanal nicht auftrat (Abbildung 72). Plausibel ist eine spezifische Bildung von 3-Methylbutanal auf Basis des Streckerabbaus der Aminosäure L-Leucin, die bereits für trockene Pflanzenprodukte nachgewiesen wurde [242].

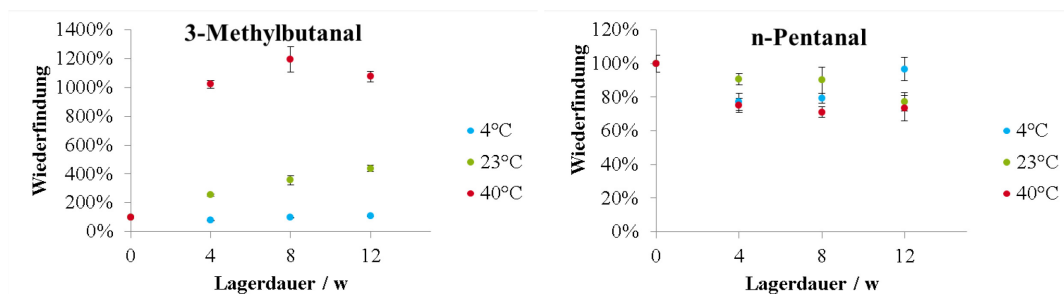


Abbildung 72: Veränderung des Signals zweier Aldehyde während der Lagerung einer 6-Kräutermischung mit Kamille bei verschiedenen Temperaturen über 12 Wochen, untersucht mit HS-SPME-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung der ermittelten Signalfächen in der gelagerten Probe bezogen auf den Ausgangswert, n=3)

Mit den Geruchsreferenzmaterialien erfolgte die Optimierung des Hundetrainings. Neben der Einführung der Ja-Nein-Entscheidung für jede einzelne Probe wurde ein Weg gefunden, um bereits während des Trainings doppelblind arbeiten zu können. Im Vergleich von zwei Trainingskonzepten konnte gezeigt werden, dass die Hunde sowohl mit der reinen Zielkomponente Kamille als auch mit verschiedenen Gemischen, die diese Zielkomponente anteilig enthielten, erfolgreich trainiert werden können.

Das Bientraining mit den Kräutermischungen wurde im Rahmen eines Hochschulpraktikums durchgeführt [243]. Trotz Protokollvariationen konnte keine korrekte Anzeige von kamillehaltigen Proben erreicht werden. Gegebenenfalls ist die Salienz von kamillespezifischen Substanzen für die Bienen im Vergleich zu anderen in den Kräutern vorkommenden Stoffen zu gering.

Untersuchung von S-Nitrosothiolen

Eine Substanzklasse mit Potential als Biomarker für die Krebserkennung sind S-Nitrosothiole. Schröder [244] konnte Hunde mit ausgewählten S-Nitrosothiolverbindungen trainieren, die anschließend Gewebeproben mit und ohne Lebertumoren voneinander unterscheiden konnten.

Herr Kai Halama [245] führte in seiner Diplomarbeit Untersuchungen mit Licht-, Kernspinresonanz- und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie für wässrige und organische Lösungen leichtflüchtiger S-Nitrosothiole durch. Die ersten beiden Techniken dienten der Charakterisierung und Untersuchung der Stabilität. Unter Anwendung der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie konnte eine Methode zur Quantifizierung des Gesamtstickstoffmonoxids, welches sich aus freiem NO und S-Nitrosothiolen zusammensetzt, entwickelt und auf einige wenige reale Atemluft- und Atemkondensatproben von Gesunden erfolgreich angewendet werden.

Darüber hinaus wurden mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie eine Trennung verschiedener S-Nitrosothiole erreicht. Durch Einsatz der Detektion mit ultravioletttem Licht konnte die Nachweisgrenze zu ca. 1 μM abgeschätzt werden. Der Gesamt-S-Nitrosothiolgehalt in Atemkondensat von Kindern wird demgegenüber im Mittel mit 1,0 μM angegeben [246]. Folglich ist diese HPLC-UV-Methode zwar für die Detektion von S-Nitrosothiolen geeignet, jedoch würde sie für die Untersuchung von physiologischen Proben wie Atemkondensat zu unempfindlich sein. Mit GC-MS konnte keine Methode zur S-Nitrosothiolbestimmung entwickelt werden. Konventionelle gaschromatographische Verfahren mit Säulenofentemperaturen von mindestens 40 °C sind für die Analyse der thermolabilen S-Nitrosothiole nicht geeignet.

Anhand einer Studie zur Langzeitstabilität von S-Nitroso-1-propanthiol in einem für die Vliesmodifizierung eingesetzten technischen Öl konnte durch Anwendung von UV-VIS-Spektroskopie bei einer Konzentration von ca. 10 mM die Halbwertszeit zu ca. 130 Tage abgeschätzt werden. Demnach scheint in dem Öl eine Stabilisierung der S-Nitrosothiole zu erfolgen. Gegebenenfalls könnten diese auch nach langer Probenlagerung, wie sie zum Teil beim Hundetraining beschrieben werden – bis zu 60 Tagen in der Studie von Ehmann *et al.* [169] –, in den adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen vorhanden sein.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von möglichen Biomarkern in der Atemluft, die für eine Diagnose von Lungenkrebs genutzt werden könnten. Auf Grundlage einer ausführlichen Literaturrecherche zum aktuellen Forschungsstand in der Atemluftanalytik im Allgemeinen und speziell hinsichtlich der Lungenkrebsthematik wurden leichtflüchtige organischer Verbindungen (VOC) als aussichtsreiche Biomarkerkandidaten ermittelt, auf die sich die Untersuchungen konzentrieren sollten.

Zunächst erfolgte die Entwicklung einer GC-Methode zur VOC-Analytik. Voraussetzung dafür war ein sorgfältiges Vorgehen bei Herstellung und Umgang mit Standardlösungen, um reproduzierbare VOC-Gehalte zu gewährleisten. Als Parameter wurden die GC-Säule, das Ofenprogramm und die Flussrate optimiert. Durch Vergleich der DHS mit verschiedenen Adsorbermaterialien und der SPME mit verschiedenen Fasern konnte die SPME mit Car/PDMS-Faser (75 µm) als beste Anreicherungstechnik ermittelt werden.

Mit dieser Methode konnten erfolgreich die VOC-Profile der drei Adenokarzinomzelllinien A549, Lu7387 und Lu7466 sowie der korrespondierenden Nährmedien erstmals quantitativ mittels *in-situ*-SPME direkt in der Zellkultur untersucht werden. Darüber hinaus wurde für Lungenkrebszellkulturen zum ersten Mal ein Vergleich verschiedener Probenahmeverfahren vorgenommen und ihr Einfluss auf das im HS analysierte VOC-Profil untersucht. Aufbauend auf diesen Untersuchungen an dem Zellkulturmodell konnten die Substanzen 1-Propanol und ausgewählte Aldehyde als potentielle Biomarker für Lungenkrebs ermittelt werden. Diese sind jedoch bei genauerer Betrachtung für eine Lungenkrebsdetektion wahrscheinlich nicht geeignet. Entweder ist der Einsatz aufgrund der zu erwartenden VOC-Hintergrundbelastung von Arzt- und Klinikräumen nicht praktikabel oder der festgestellte Einfluss der Zellen in den Kulturen stimmt nicht mit den Beobachtungen in Realproben überein. Darüber hinaus ist auch damit zu rechnen, dass Substanzen von den für die Anzucht eingesetzten Einwegzellkulturflaschen emittieren oder dem Nährmedium entstammen, wodurch sich Quellen für Fehlinterpretationen ergeben. Im Vergleich dieses Modells mit Untersuchungen von Realproben konnten nur wenige Gemeinsamkeiten beobachtet werden. Folglich ist das gewählte Zellkulturmodell für die Biomarkersuche zur Lungenkrebsdetektion nicht geeignet.

Theoretisch bestünde die Möglichkeit, Lungenkrebszelllinien nicht nur mit zellfreiem Nährmedium zu vergleichen, sondern auch mit Kulturen von nicht-entarteten Zellen. Allerdings wurde diesbezüglich von Seiten der EPO GmbH deutlich gemacht, dass die Kultivierung von solchen Zellen deutlich schwieriger ist und die Zellkulturen im Allgemeinen nur über wenige Passagen vital gehalten werden können. Da sich auf Basis der bisher durchgeführten Untersuchungen Zweifel an der Eignung der Zellkulturen als *in-vitro*-Modell für die Lungenkrebskrankung für die Biomarkersuche ergeben hatten, wäre dieser Ansatz wahrscheinlich nicht zielführend. Allerdings gibt es noch alternative Varianten für die Zellanzucht, die gegebenenfalls als Modell erfolgversprechender sein können. Anstelle der hyperoxischen Bedingungen könnte die Zellanzucht unter Sauerstoffmangel durchgeführt werden. Auch die Anwendung eines dreidimensionalen Zellmodells, indem sich Nährstoff- und Sauerstoffgradienten innerhalb der Zellkultur ausbilden können, würde Bedingungen ermöglichen, die realitätsnäher sind als die konventionelle, zweidimensionale Kultur. Darüber hinaus gibt es auch Xenografts, bei denen Tumore auf lebenden Organismen, wie Mäusen und Ratten, wachsen [247].

Für die Probenahme realer Atemluft erfolgte der Einsatz eines 1 L-Gassammelrohres. Im theoretischen Vergleich mit alternativen Materialien wurden durch die Verwendung eines Glaskörpers die wenigsten Probleme im Hinblick auf Kontamination gesehen, allerdings ist mit einer Analytadsorption an der Glaswand zu rechnen. Unter Einsatz eines solchen Gassammelrohres konnte erfolgreich ein Gasmodell entwickelt werden, bei dem der Glaskörper mit angefeuchteter,

synthetischer Luft gespült und anschließend mit methanolischer VOC-haltiger Standardlösung dotiert wurde. Mit diesem Gasmodell erfolgte für die SPME mit Car/PDMS-Faser der Test verschiedener Extraktionszeiten und -temperaturen, so dass im Ergebnis 1 h bei Raumtemperatur (23 °C) als bester Kompromiss ermittelt wurde.

Auf Basis von Screeninguntersuchungen von Atemluftproben Lungenkrebskranker in Kombination mit der anfänglich durchgeführten Literaturrecherche konnten 24 Substanzen als Ziel-VOC – Alkane, Aromaten, Carbonylverbindungen und 1-Butanol – ausgewählt werden. Darüber hinaus wurde das Gasmodell um drei Matrixsubstanzen – Isopren, Aceton und 2-Propanol – erweitert, die aufgrund der zu erwartenden hohen Gehalte in der Atemluft gegebenenfalls Einfluss auf die VOC-Verteilung während der SPME nehmen könnten. Eine Berücksichtigung von Matrix-VOC in einem Gasmodell für die Atemluftanalytik mit SPME wird hier zum ersten Mal präsentiert; ebenso war keine Veröffentlichung ermittelbar, in der die ausgewählten Zielsubstanzen in dieser Kombination in der Biomarkersuche für die Lungenkrebsdetektion untersucht wurden. Auf Basis des Gasmodells wurde für die 24 Zielsubstanzen eine qualitätsgesicherte HS-SPME-GC-MS-Analytik durchgeführt. An die Kalibrierung mit neun Konzentrationsniveaus, die quadratische Regressionskurven ergab, schloss sich die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen an. Diese lagen für die 24 Ziel-VOC im niedrigen $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ -Bereich und damit in einer vergleichbaren Größenordnung von publizierten Methoden. Um eine Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse über den Studienzeitraum zu gewährleisten, erfolgte die Quantifizierung auf der Basis von drei arbeitstäglich untersuchten Qualitätskontrollstandardproben.

In Kooperation mit zwei Berliner Kliniken konnte eine Studie zur Untersuchung von Atemluftproben von Lungenkrebspatienten und Gesunden erfolgreich durchgeführt werden, die über einen Zeitraum von 14 Monaten lief. Dabei erfolgte die Probenahme von gemischter Ausatemluft mit einem Atemzug vor Ort in den Kliniken bzw. für einige Gesunde auch an der BAM nach einer freigegebenen Standardarbeitsanweisung und für die Patienten mit Volumenkontrolle. Nachteilig an der gewählten Volumenkontrolle ist, dass sie nur für die qualitativ analysierten Atemluftproben in den Probenahmeröhrchen umgesetzt wurde, jedoch nicht für die quantitativ untersuchten Proben in den Gassammelrohren; folglich besteht eine gewisse Unsicherheit, ob die Patienten das zum Füllen des Gassammelrohres benötigte Atemvolumen in jedem Fall bereitgestellt haben. Hier wäre zukünftig eine direkte Überprüfung des Atemvolumens bei Probenahme mit dem Gassammelrohr wünschenswert.

Insgesamt konnten in die Auswertung die Atemluftproben von 37 Patienten und 23 Gesunden einbezogen werden. Ausgehend von den Studiendaten und den Eigenversuchen wurde eine akute Beeinflussung der Atemzusammensetzung durch die Umgebungsluft für die Alkane, n-Propylbenzen und Propanal belegt. Darin liegt ein großes Defizit der Atemluftanalyse, da kein geeignetes Modell für eine rechnerische Korrektur der bestimmten Atemluftgehalte um die Blindwertgehalte existiert. Ein möglicher Ansatz, um den Einfluss des Blindwertes auf die Analysenwerte in zukünftigen Projekten zu reduzieren, besteht in der Beprobung von alveolarer anstelle von gemischter Ausatemluft; allerdings ist diese Probenahme deutlich aufwendiger.

Für das Rauchverhalten zeigten sich signifikante Unterschiede im Benzen-, Ethylbenzen- und n-Heptangehalt, die im Atem der aktiven Raucher deutlich erhöht vorlagen. Dabei ist mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 91 % eine nahezu vollständig korrekte Zuordnung zu aktivem Raucher oder Nichtraucher auf Basis des Benzengehalts der Atemluft möglich. Folglich eignen sich weder die Alkane, noch die Aromaten oder Propanal als potentielle Biomarker für die Lungenkrebserkennung.

Im Rahmen der Studie wurden die Gehalte von 24 Zielsubstanzen in der Atemluft von Lungenkrebspatienten und Gesunden analysiert. Durch Anwendung eines Mann-Whitney-U-Tests wurden zunächst die Gehalte von neun VOC in der Atemluft als signifikant verschieden zwischen allen Lungenkrebspatienten und allen Gesunden festgestellt; während es bei Auswertung der

nichtrauchenden Untergruppen 11 Substanzen waren. Dabei erlaubte die Betrachtung von 1-Butanol als einzelne Substanz bereits eine Klassifizierung von Lungenkrebskranken und Gesunden mit einer Sensitivität von 92% und einer Spezifität von 78%. Durch Anwendung einer Diskriminanzanalyse mit Leave-One-out-Kreuzvalidierung konnte ein Set bestehend aus vier VOC – 1-Butanol, n-Hexanal, 2-Butanon und 2-Pentanon – ermittelt werden, die mit 92% Sensitivität und 87% Spezifität eine bessere, aber nicht vollständig korrekte Zuordnung der Atemluftproben ermöglichte. Alle vier Substanzen wurden bereits in anderen Studien als potentielle Biomarker für die Lungenkrebsdetektion abgeleitet, jedoch noch nicht in dieser Kombination. Die Ergebnisse von zwei Verlaufskontrolluntersuchungen von Patienten nach der Tumoresektion ergaben zusätzliche Hinweise, dass die Aldehyde potentielle Biomarker für die Lungenkrebserkennung sein könnten. Um jedoch belastbare Aussagen aus solchen Verlaufskontrolluntersuchungen ziehen zu können, müssten deutlich mehr Proben untersucht und der Beobachtungszeitraum am besten auf fünf Jahre nach der Tumoresektion ausgedehnt werden.

Für alle abgeleiteten potentiellen Biomarker sind mögliche anabolische Vorgänge bekannt. Ferner handelt es sich bei allen Substanzen um sauerstoffhaltige Spezies. Da Krebs mit erhöhtem oxidativen Stress assoziiert ist, wäre eine verstärkte Bildung dieser Substanzen in Zusammenhang mit der Erkrankung plausibel. Es bleibt jedoch die Frage bestehen, ob die erhöhten VOC-Gehalte im Atem der Lungenkrebserkrankten spezifisch durch Lungenkrebs verursacht wurden, oder ob sie aus einer allgemeinen Entzündungsreaktion der Lunge resultierten und damit auch bei anderen Erkrankungen auftreten würden. Zur Klärung dieser Frage wäre eine weitere Studie notwendig, bei der die vier potentiellen Biomarker in der Atemluft von Lungenkrebskranken, Gesunden und Menschen mit anderen (Lungen-) Erkrankungen als Lungenkrebs untersucht würden.

Es wurden auch einige Gewebeproben von Lungentumoren im Hinblick auf unterschiedliche VOC-Profile zwischen pathologisch unauffälligem und verändertem Gewebe untersucht. Die angewandte SPME-Methode, die im Wesentlichen aus den Erfahrungen im Zusammenhang mit den Zellkulturversuchen abgeleitet wurde, ist dafür nur bedingt geeignet. Es wurden kritische Stellen identifiziert und Ansätze für eine Optimierung diskutiert, die als Grundlage für die Ermittlung quantitativer Daten berücksichtigt werden sollten.

Neben den Atemluftproben in Gassammelrohren wurden auch Atemluftproben in adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen qualitativ analysiert. Die Untersuchung dieser Atemproben auf ausgewählte VOC war durch die starke Hintergrundbelastung der Vliese beeinträchtigt. Auch für diese Proben konnten deutliche Unterschiede im VOC-Profil von Gesunden und Kranken beobachtet werden. Gleichartige Atemluftproben werden für das Hundetraining eingesetzt, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist. Die Kombination der analytischen Untersuchung der Atemluftproben in Probenahmeröhrchen mit dem Hundetraining ist nur zielführend, wenn an das erfolgreich abgeschlossene Training ein Test der Biomarkerkandidaten angefügt wird. Für solche Tests wurden die Grundlagen mit der hier vorliegenden Arbeit gelegt.

Die dargelegten Ergebnisse zeigen deutlich das Potential der Biomarkersuche für die Entwicklung einer nicht-invasiven Lungenkrebsdiagnose. Die hier entwickelte Atemluftanalytik beinhaltet ein komplexes System zur Qualitätssicherung bei der Probenahme und Analyse, wobei dieser hohe Aufwand im Rahmen der Krankenhausroutine nicht zu leisten ist. Die anspruchsvolle GC-MS-Technik stellt durchaus eine gesicherte Grundlage eines Referenzverfahrens zur Entwicklung mobiler, elektronischer Sensorsysteme dar. Darüber hinaus ist die Biomarkersuche auch in anderen humanen Matrices, wie z. B. Urin, zu empfehlen, da die Probenahme besser standardisierbar und leichter in den Klinikalltag zu integrieren ist. Die Untersuchung anderer Matrices auf das Vorkommen potentieller Biomarker und ihr Verhalten bei Vorliegen einer Lungenkrebserkrankung könnte ein zusätzlicher Weg sein, um die Plausibilität der Kandidaten zu prüfen.

Literaturverzeichnis

1. Ziener C. E. and Braunsdorf P. P. (2014) Trace analysis in end-exhaled air using direct solvent extraction in gas sampling tubes: tetrachloroethene in workers as an example. *International Journal of Analytical Chemistry* 2014: 904512
2. Bigazzi A. Y., Figliozzi M. A., Luo W. T. and Pankow J. F. (2016) Breath biomarkers to measure uptake of volatile organic compounds by bicyclists. *Environmental Science & Technology* 50 (10): 5357-5363
3. Kahler H. (1949) Diagnostik durch Sehen und Tasten: eine Semiotik der Inspektion und Palpation. Springer-Verlag, Wien/ Österreich
4. Pauling L., Robinson A. B., Teranish.R and Cary P. (1971) Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (10): 2374-2376
5. Lovell W. S. (1972) Breath tests for determining alcohol in blood. *Science* 178 (4058): 264-272
6. Oneill H. J., Gordon S. M., Oneill M. H., Gibbons R. D. and Szidon J. P. (1988) A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung-cancer. *Clinical Chemistry* 34 (8): 1613-1618
7. Rutgers S. R., van der Mark T. W., Coers W., Moshage H., Timens W., Kauffman H. F., Koeter G. H. and Postma D. S. (1999) Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 54 (7): 576-580
8. Aghdassi E. and Allard J. P. (2000) Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radical Biology and Medicine* 28 (6): 880-886
9. Moretti M., Phillips M., Abouzeid A., Cataneo R. N. and Greenberg J. (2004) Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190 (5): 1184-1190
10. Phillips M., Cataneo R. N., Ditkoff B. A., Fisher P., Greenberg J., Gunawardena R., Kwon C. S., Tietje O. and Wong C. (2006) Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath. *Breast Cancer Research and Treatment* 99 (1): 19-21
11. Phillips M., Altorki N., Austin J. H., Cameron R. B., Cataneo R. N., Greenberg J., Kloss R., Maxfield R. A., Munawar M. I., Pass H. I., Rashid A., Rom W. N. and Schmitt P. (2007) Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. *Cancer Biomarkers* 3 (2): 95-109
12. Phillips M., Cataneo R. N., Condos R., Erickson G. A. R., Greenberg J., La Bombardi V., Munawar M. I. and Tietje O. (2007) Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis* 87 (1): 44-52
13. Wehinger A., Schmid A., Mechtcheriakov S., Ledochowski M., Grabmer C., Gastl G. A. and Amann A. (2007) Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas. *International Journal of Mass Spectrometry* 265 (1): 49-59
14. King J., Kupferthaler A., Unterkofler K., Koc H., Teschl S., Teschl G., Miekisch W., Schubert J., Hinterhuber H. and Amann A. (2009) Isoprene and acetone concentration profiles during exercise on an ergometer. *Journal of Breath Research* 3 (2): 027006
15. Buszewski B., Ulanowska A., Ligor T., Denderz N. and Amann A. (2009) Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 23 (5): 551-556
16. Fuchs P., Loeseken C., Schubert J. K. and Miekisch W. (2010) Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *International Journal of Cancer* 126 (11): 2663-2670

17. Ulanowska A., Kowalkowski T., Hryniewicz K., Jackowski M. and Buszewski B. (2011) Determination of volatile organic compounds in human breath for *Helicobacter pylori* detection by SPME-GC/MS. *Biomedical Chromatography* 25 (3): 391-397
18. Ulanowska A., Kowalkowski T., Trawinska E. and Buszewski B. (2011) The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer. *Journal of Breath Research* 5 (4): 046008
19. Mangler M., Freitag C., Lanowska M., Staack O., Schneider A. and Speiser D. (2012) Volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath of patients with breast cancer in a clinical setting. *Ginekologia Polska* 83 (10): 730-736
20. Filipiak W., Filipiak A., Sponring A., Schmid T., Zelger B., Ager C., Klodzinska E., Denz H., Pizzini A., Lucciarini P., Jamnig H., Troppmair J. and Amann A. (2014) Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers. *Journal of Breath Research* 8 (2): 027111
21. Schnabel R., Fijten R., Smolinska A., Dallinga J., Boumans M. L., Stobberingh E., Boots A., Roekaerts P., Bergmans D. and van Schooten F. J. (2015) Analysis of volatile organic compounds in exhaled breath to diagnose ventilator-associated pneumonia. *Scientific Reports* 5: 17179
22. Gaida A., Holz O., Nell C., Schuchardt S., Lavae-Mokhtari B., Kruse L., Boas U., Langejuergen J., Allers M., Zimmermann S., Vogelmeier C., Koczulla A. R. and Hohlfeld J. M. (2016) A dual center study to compare breath volatile organic compounds from smokers and non-smokers with and without COPD. *Journal of Breath Research* 10 (2): 026006
23. Beauchamp J. D., Pleil J. D., Dweik R. A., Herbig J. and Risby T. H. (2016) International Association of Breath Research 10th anniversary conference at the Schoenbrunn Palace in Vienna, Austria. *Journal of Breath Research* 10 (1): 019001
24. Hakim M., Broza Y. Y., Barash O., Peled N., Phillips M., Amann A. and Haick H. (2012) Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chemical Reviews* 112 (11): 5949-5966
25. Vansteenkiste J., Doms C., Mascaux C. and Nackaerts K. (2012) Screening and early detection of lung cancer. *Annals of Oncology* 23 (Supplement 10): 320-327
26. Queralto N., Berliner A. N., Goldsmith B., Martino R., Rhodes P. and Lim S. H. (2014) Detecting cancer by breath volatile organic compound analysis: a review of array-based sensors. *Journal of Breath Research* 8 (2): 027112
27. Kaatsch P., Spix C., Katalinic A., Hentschel S., Luttmann S., Stegmaier C., Caspritz S., Christ M., Ernst A., Folkerts J., Hansmann J., Klein S., Kranzhöfer K., Kunz B., Manegold K., Penzkofer A., Tremel K., Weg-Remers S., Wittenberg K., Baras N., Barnes B., Bertz J., Buttman-Schweiger N., Dahm S., Fiebig J., Franke M., Haberland J., Kraywinkel K., Wienecke A. and Wolf U. (2015) Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg), rucksaldruck, Berlin/ Deutschland
28. Mountain C. F. (1997) Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 111 (6): 1710-1717
29. Strimbu K. and Tavel J. A. (2010) What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and Aids* 5 (6): 463-466
30. Atkinson A. J., Colburn W. A., DeGruttola V. G., DeMets D. L., Downing G. J., Hoth D. F., Oates J. A., Peck C. C., Schooley R. T., Spilker B. A., Woodcock J. and Zeger S. L. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 69 (3): 89-95
31. Zhang A. H., Sun H., Yan G. L., Wang P. and Wang X. J. (2016) Mass spectrometry-based metabolomics: applications to biomarker and metabolic pathway research. *Biomedical Chromatography* 30 (1): 7-12

32. Buljubasic F. and Buchbauer G. (2015) The scent of human diseases: a review on specific volatile organic compounds as diagnostic biomarkers. *Flavour and Fragrance Journal* 30 (1): 5-25
33. Costello B. D., Amann A., Al-Kateb H., Flynn C., Filipiak W., Khalid T., Osborne D. and Ratcliffe N. M. (2014) A review of the volatiles from the healthy human body. *Journal of Breath Research* 8 (1): 014001
34. Buszewski B., Kesy M., Ligor T. and Amann A. (2007) Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomedical Chromatography* 21 (6): 553-566
35. Risby T. H. and Solga S. F. (2006) Current status of clinical breath analysis. *Applied Physics B-Lasers and Optics* 85 (2-3): 421-426
36. Lang H. (2007) Beatmung für Einsteiger: eine Lernhilfe für Intensivpersonal. 1. Auflage Betamungsfortbildung und Verlag Hartmut Lang, Hamburg/ Deutschland
37. Henry W. (1803) Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 93: 29-42
38. Farhi L. E. (1967) Elimination of inert gas by the lung. *Respiration Physiology* 3 (1): 1-11
39. King J. L., Unterkofler K., Teschl G., Teschl S., Koc H., Hinterhuber H. and Amann A. (2011) A mathematical model for breath gas analysis of volatile organic compounds with special emphasis on acetone. *Journal of Mathematical Biology* 63 (5): 959-999
40. Amann A., Miekisch, W., Pleil, J., Risby, T., Schubert, J. (2010) Methodological issues of sample collection and analysis of exhaled breath. *European Respiratory Monograph* 49: 96-114
41. Sethi S., Nanda R. and Chakraborty T. (2013) Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 26 (3): 462-475
42. Corradi M., Gergelova P. and Mutti A. (2010) Use of exhaled breath condensate to investigate occupational lung diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 10 (2): 93-98
43. Effros R. M., Dunning M. B., Biller J. and Shaker R. (2004) The promise and perils of exhaled breath condensates. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (6): L1073-L1080
44. Mutlu G. M., Garey K. W., Robbins R. A., Danziger L. H. and Rubinstein I. (2001) Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (5): 731-737
45. Pleil J. D. (2008) Role of exhaled breath biomarkers in environmental health science. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 11 (8): 613-629
46. ATS/ERS (2005) ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171 (8): 912-930
47. Caspary W. F. (1995) ¹³C-Harnstoff-Atemtest – Patientenfreundlicher «Goldstandard» in der Diagnostik der Helicobacter-pylori-Infektion mit langfristigem Kostensparpotential *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 120 (27): 976-978
48. Ostrander C. R., Cohen R. S., Hopper A. O., Shahin S. M., Kerner J. A., Johnson J. D. and Stevenson D. K. (1983) Breath hydrogen analysis - a review of the methodologies and clinical-applications. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2 (3): 525-533
49. Schwoebel H., Schubert R., Sklorz M., Kischkel S., Zimmermann R., Schubert J. K. and Miekisch W. (2011) Phase-resolved real-time breath analysis during exercise by means of smart processing of PTR-MS data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401 (7): 2079-2091
50. Dillard C. J., Dumelin E. E. and Tappel A. L. (1977) Effect of dietary vitamin-E on expiration of pentane and ethane by rat. *Lipids* 12 (1): 109-114

51. Phillips M., Cataneo R. N., Cummin A. R. C., Gagliardi A. J., Gleeson K., Greenberg J., Maxfield R. A. and Rom W. N. (2003) Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* 123 (6): 2115-2123
52. Phillips M., Altorki N., Austin J. H. M., Cameron R. B., Cataneo R. N., Kloss R., Maxfield R. A., Munawar M. I., Pass H. I., Rashid A., Rom W. N., Schmitt P. and Wai J. (2008) Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers. *Clinica Chimica Acta* 393 (2): 76-84
53. Buszewski B., Ulanowska A., Kowalkowski T. and Cieslinski K. (2012) Investigation of lung cancer biomarkers by hyphenated separation techniques and chemometrics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 50 (3): 573-581
54. Paredi P., Kharitonov S. A., Leak D., Ward S., Cramer D. and Barnes P. J. (2000) Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162 (2): 369-373
55. Corradi M., Folesani G., Andreoli R., Manini P., Bodini A., Piacentini G., Carraro S., Zanconato S. and Baraldi E. (2003) Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167 (3): 395-399
56. Bruins M., Rahim Z., Bos A., van de Sande W. W. J., Endtz H. P. and van Belkum A. (2013) Diagnosis of active tuberculosis by e-nose analysis of exhaled air. *Tuberculosis* 93 (2): 232-238
57. Choi S. W., Maiga M., Maiga M. C., Atudorei V., Sharp Z. D., Bishai W. R. and Timmins G. S. (2014) Rapid in vivo detection of isoniazid-sensitive *Mycobacterium tuberculosis* by breath test. *Nature Communications* 5: 4989
58. Tassopoulos C. N., Barnett D. and Fraser T. R. (1969) Breath-acetone and blood-sugar measurements in diabetes. *Lancet* 1 (7609): 1282-1286
59. Greiter M. B., Keck L., Siegmund T., Hoeschen C., Oeh U. and Paretzke H. G. (2010) Differences in exhaled gas profiles between patients with type 2 diabetes and healthy controls. *Diabetes Technology & Therapeutics* 12 (6): 455-463
60. Miekisch W., Kischkel S., Sawacki A., Liebau T., Mieth M. and Schubert J. K. (2008) Impact of sampling procedures on the results of breath analysis. *Journal of Breath Research* 2 (2): 026007
61. Kwak J. and Preti G. (2011) Volatile disease biomarkers in breath: a critique. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12 (7): 1067-1074
62. Luengo-Fernandez R., Leal J., Gray A. and Sullivan R. (2013) Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncology* 14 (12): 1165-1174
63. De Angelis R., Sant M., Coleman M. P., Francisci S., Baili P., Pierannunzio D., Trama A., Visser O., Brenner H., Ardanaz E., Bielska-Lasota M., Engholm G., Nennecke A., Siesling S., Berrino F. and Capocaccia R. (2014) Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncology* 15 (1): 23-34
64. Sihoe A. D. L. and Yim A. P. C. (2004) Lung cancer staging. *Journal of Surgical Research* 117 (1): 92-106
65. Flemming Moller P. (1950) The value of roentgen examination in the diagnosis of bronchogenic cancer. *The Journal of the Faculty of Radiologists. Faculty of Radiologists (Great Britain)* 2 (2): 102-117
66. Poli D., Carbognani P., Corradi M., Goldoni M., Acampa O., Balbi B., Bianchi L., Rusca M. and Mutti A. (2005) Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respiratory Research* 6: 71
67. Ligor M., Ligor T., Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., Klieber M., Denz H., Fiegl M., Hilbe W., Weiss W., Lukas P., Jamnig H., Hackl M., Buszewski B., Miekisch W., Schubert J. and Amann A. (2009) Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients

- with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47 (5): 550-560
68. Phillips M., Gleeson K., Hughes J. M. B., Greenberg J., Cataneo R. N., Baker L. and McVay W. P. (1999) Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* 353 (9168): 1930-1933
69. Yu H., Xu L. and Wang P. (2005) Solid phase microextraction for analysis of alkanes and aromatic hydrocarbons in human breath. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 826 (1-2): 69-74
70. Gaspar E. M., Lucena A. F., da Costa J. D. and das Neves H. C. (2009) Organic metabolites in exhaled human breath - a multivariate approach for identification of biomarkers in lung disorders. *Journal of Chromatography A* 1216 (14): 2749-2756
71. Machado R. F., Laskowski D., Deffenderfer O., Burch T., Zheng S., Mazzone P. J., Mekhail T., Jennings C., Stoller J. K., Pyle J., Duncan J., Dweik R. A. and Erzurum S. C. (2005) Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171 (11): 1286-1291
72. Kneepkens C. M. F., Lepage G. and Roy C. C. (1994) The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid-peroxidation *Free Radical Biology and Medicine* 17 (2): 127-160
73. Phillips M., Cataneo R. N., Greenberg J., Gunawardena R. and Rahbari-Oskoui F. (2003) Increased oxidative stress in younger as well as in older humans. *Clinica Chimica Acta* 328 (1-2): 83-86
74. Mitsui T. and Kondo T. (2003) Inadequacy of theoretical basis of breath methylated alkane contour for assessing oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 333 (1): 91-91
75. Manolis A. (1983) The diagnostic potential of breath analysis. *Clinical Chemistry* 29 (1): 5-15
76. Buszewski B., Ligor T., Jezierski T., Wenda-Piesik A., Walczak M. and Rudnicka J. (2012) Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with discrimination by canines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 (1): 141-146
77. Poli D., Goldoni M., Corradi M., Acampa O., Carbognani P., Internullo E., Casalini A. and Mutti A. (2010) Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatization SPME-GC/MS. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 (27): 2643-2651
78. Kischkel S., Miekisch W., Sawacki A., Straker E. M., Trefz P., Amann A. and Schubert J. K. (2010) Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects - confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms. *Clinica Chimica Acta* 411 (21-22): 1637-1644
79. Guadagni R., Miraglia N., Simonelli A., Silvestre A., Lamberti M., Feola D., Acampora A. and Sannolo N. (2011) Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers. *Analytica Chimica Acta* 701 (1): 29-36
80. Deng C. L., Ning; Zhang, Xiangmin (2004) Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 813: 47-52
81. Xu H., Lv L. L., Hu S. and Song D. D. (2010) High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction with in-drop derivatization. *Journal of Chromatography A* 1217 (16): 2371-2375
82. Deng C. Z., X., Li, N. (2004) Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary GC-MS. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 808: 269-277

83. Song G., Qin T., Liu H., Xu G. B., Pan Y. Y., Xiong F. X., Gu K. S., Sun G. P. and Chen Z. D. (2010) Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. *Lung Cancer* 67 (2): 227-231
84. Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., Klieber M., Schwarz K., Ligor M., Ligor T., Filipiak W., Denz H., Fiegl M., Hilbe W., Weiss W., Lukas P., Jamnig H., Hackl M., Haidenberger A., Buszewski B., Miekisch W., Schubert J. and Amann A. (2009) Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC Cancer* 9: 348
85. Rudnicka J., Kowalkowski T., Ligor T. and Buszewski B. (2011) Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879 (30): 3360-3366
86. Tsao A. S. (2013) Tumors of the lungs: lung carcinoma. in: Pulmonary Disorders, last revision [Manual Professional Edition, Online Edition]. Zu finden unter: <http://www.merckmanuals.com/professional/pulmonary-disorders/tumors-of-the-lungs/lung-carcinoma#sec05-ch062-ch062b-1405>; abgerufen am: 18.01.2016
87. Kronz J. D., Westra W. H. and Epstein J. I. (1999) Mandatory second opinion surgical pathology at a large referral hospital. *Cancer* 86 (11): 2426-2435
88. Cha D. M., Liu M. M., Zeng Z. R., Cheng D. E. and Zhan G. Q. (2006) Analysis of fatty acids in lung tissues using gas chromatography-mass spectrometry preceded by derivatization-solid-phase microextraction with a novel fiber. *Analytica Chimica Acta* 572 (1): 47-54
89. Kalluri U., Naiker M. and Myers M. A. (2014) Cell culture metabolomics in the diagnosis of lung cancer - the influence of cell culture conditions. *Journal of Breath Research* 8 (2): 027109
90. Amann A., Zwierzina M., Gamerith G., Bitsche M., Huber J. M., Vogel G. F., Blumer M., Koeck S., Pechriggl E. J., Kelm J. M., Hilbe W. and Zwierzina H. (2014) Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour - stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *Plos One* 9 (3): e92511
91. Smith D., Wang T. S., Sule-Suso J., Spanel P. and El Haj A. (2003) Quantification of acetaldehyde released by lung cancer cells in vitro using selected ion flow tube mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (8): 845-850
92. Shan G. (2006) Detection of aldehydes in lung cancer cell culture by gas chromatography/mass spectrometry and solid-phase microextraction with on fiber derivatization. Wissenschaftliche Abschlussarbeit zur Erlangung des Titels Master of Science, Texas A&M University
93. Chen X., Xu F. J., Wang Y., Pan Y. F., Lu D. J., Wang P., Ying K. J., Chen E. G. and Zhang W. M. (2007) A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. *Cancer* 110 (4): 835-844
94. Filipiak W., Sponring A., Mikoviny T., Ager C., Schubert J., Miekisch W., Amann A. and Troppmair J. (2008) Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell International* 8: 17
95. Pyo J. S., Ju H. K., Park J. H. and Kwon S. W. (2008) Determination of volatile biomarkers for apoptosis and necrosis by solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry: A pharmacometabolomic approach to cisplatin's cytotoxicity to human lung cancer cell lines. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 876 (2): 170-174
96. Barash O., Peled N., Hirsch F. R. and Haick H. (2009) Sniffing the unique "odor print" of non-small-cell lung cancer with gold nanoparticles. *Small* 5 (22): 2618-2624
97. Sponring A., Filipiak W., Mikoviny T., Ager C., Schubert J., Miekisch W., Amann A. and Troppmair J. (2009) Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. *Anticancer Research* 29 (1): 419-426

98. Sule-Suso J., Pysanenko A., Spanel P. and Smith D. (2009) Quantification of acetaldehyde and carbon dioxide in the headspace of malignant and non-malignant lung cells in vitro by SIFT-MS. *Analyst* 134 (12): 2419-2425
99. Filipiak W., Sponring A., Filipiak A., Ager C., Schubert J., Miekisch W., Amann A. and Troppmair J. (2010) TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 19 (1): 182-195
100. Brunner C., Szymczak W., Hoellriegl V., Moertl S., Oelmez H., Bergner A., Huber R. M., Hoeschen C. and Oeh U. (2010) Discrimination of cancerous and non-cancerous cell lines by headspace-analysis with PTR-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (6): 2315-2324
101. Sponring A., Filipiak W., Ager C., Schubert J., Miekisch W., Amann A. and Troppmair J. (2010) Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in the headspace of NCI-H1666 lung cancer cells. *Cancer Biomarkers* 7 (3): 153-161
102. Brunner C., Szymczak W., Li W., Hoeschen C., Mortl S., Eckardt-Schupp F. and Oeh U. (2011) Headspace measurements of irradiated in vitro cultured cells using PTR-MS. *Radiation and Environmental Biophysics* 50 (1): 209-217
103. Barash O., Peled N., Tisch U., Bunn P. A., Hirsch F. R. and Haick H. (2012) Classification of lung cancer histology by gold nanoparticle sensors. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 8 (5): 580-589
104. Wang Y. S., Hu Y. J., Wang D., Yu K., Wang L., Zou Y. C., Zhao C., Zhang X. L., Wang P. and Ying K. J. (2012) The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines. *Cancer Biomarkers* 11 (4): 129-137
105. Rutter A. V., Chippendale T. W. E., Yang Y., Spanel P., Smith D. and Sule-Suso J. (2013) Quantification by SIFT-MS of acetaldehyde released by lung cells in a 3D model. *Analyst* 138 (1): 91-95
106. Thekedar B., Oeh U., Szymczak W., Hoeschen C. and Paretzke H. G. (2011) Influences of mixed expiratory sampling parameters on exhaled volatile organic compound concentrations. *Journal of Breath Research* 5 (1): 016001
107. Boots A. W., van Berkel J. J. B. N., Dallinga J. W., Smolinska A., Wouters E. F. and van Schooten F. J. (2012) The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *Journal of Breath Research* 6 (2): 027108
108. Birken T., Schubert J., Miekisch W. and Noldge-Schomburg G. (2006) A novel visually CO₂ controlled alveolar breath sampling technique. *Technology and Health Care* 14 (6): 499-506
109. Miekisch W., Schubert J. K. and Noldge-Schomburg G. F. E. (2004) Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds. *Clinica Chimica Acta* 347 (1-2): 25-39
110. Preti G., Labows J. N., Kostelc J. G., Aldinger S. and Daniele R. (1988) Analysis of lung air from patients with bronchogenic carcinoma and controls using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 432: 1-11
111. Mochalski P., Wzorek B., Sliwka I. and Amann A. (2009) Suitability of different polymer bags for storage of volatile sulphur compounds relevant to breath analysis. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877 (3): 189-196
112. Mochalski P., King J., Unterkofler K. and Amann A. (2013) Stability of selected volatile breath constituents in Tedlar, Kynar and Flexfilm sampling bags. *Analyst* 138 (5): 1405-1418
113. Scott-Thomas A. J., Syhre M., Pattemore P. K., Epton M., Laing R., Pearson J. and Chambers S. T. (2010) 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulmonary Medicine* 10: 56
114. Batterman S. A., Zhang G. Z. and Baumann M. (1998) Analysis and stability of aldehydes and terpenes in electropolished canisters. *Atmospheric Environment* 32 (10): 1647-1655
115. Pleil J. D. and Lindstrom A. B. (1995) Measurement of volatile organic-compounds in exhaled breath as collected in evacuated electropolished canisters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 665 (2): 271-279

116. Mueller W., Schubert J., Benzing A. and Geiger K. (1998) Method for analysis of exhaled air by microwave energy desorption coupled with gas chromatography flame ionization detection mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 716 (1-2): 27-38
117. Miekisch W. and Schubert J. K. (2006) From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical developments in breath analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 25 (7): 665-673
118. Mieth M., Kischkel S., Schubert J. K., Hein D. and Miekisch W. (2009) Multibed needle trap devices for on site sampling and preconcentration of volatile breath biomarkers. *Analytical Chemistry* 81 (14): 5851-5857
119. Kwak J., Fan M., Harshman S. W., Garrison C. E., Dershem V. L., Phillips J. B., Grigsby C. C. and Ott D. K. (2014) Evaluation of Bio-VOC sampler for analysis of volatile organic compounds in exhaled breath. *Metabolites* 4 (4): 879-888
120. Phillips C., Mac Parthalain N., Syed Y., Deganello D., Claypole T. and Lewis K. (2014) Short-term intra-subject variation in exhaled volatile organic compounds (VOCs) in COPD patients and healthy controls and its effect on disease classification. *Metabolites* 4 (2): 300-318
121. Sukul P., Trefz P., Schubert J. K. and Miekisch W. (2014) Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath. *Journal of Breath Research* 8 (3): 037102
122. Kischkel S., Miekisch W., Fuchs P. and Schubert J. K. (2012) Breath analysis during one-lung ventilation in cancer patients. *European Respiratory Journal* 40 (3): 706-713
123. Kushch I., Arendacka B., Stolz S., Mochalski P., Filipiak W., Schwarz K., Schwentner L., Schmid A., Dzien A., Lechleitner M., Witkovsky V., Miekisch W., Schubert J., Unterkofler K. and Amann A. (2008) Breath isoprene - aspects of normal physiology related to age, gender and cholesterol profile as determined in a proton transfer reaction mass spectrometry study. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 46 (7): 1011-1018
124. Schwarz K., Pizzini A., Arendacka B., Zerlauth K., Filipiak W., Schmid A., Dzien A., Neuner S., Lechleitner M., Scholl-Burgi S., Miekisch W., Schubert J., Unterkofler K., Witkovsky V., Gastl G. and Amann A. (2009) Breath acetone-aspects of normal physiology related to age and gender as determined in a PTR-MS study. *Journal of Breath Research* 3 (2): 027003
125. Boshier P. R., Cushnir J. R., Priest O. H., Marczin N. and Hanna G. B. (2010) Variation in the levels of volatile trace gases within three hospital environments: implications for clinical breath testing. *Journal of Breath Research* 4 (3): 031001
126. Lemoyne M., Vangossum A., Kurian R., Ostro M., Axler J. and Jeejeebhoy K. N. (1987) Breath pentane analysis as an index of lipid-peroxidation - a functional test of vitamin-E status. *American Journal of Clinical Nutrition* 46 (2): 267-272
127. Cazzola M., Segreti A., Capuano R., Bergamini A., Martinelli E., Calzetta L., Rogliani P., Ciaprinì C., Ora J., Paolesse R., Di Natale C. and D'Amico A. (2015) Analysis of exhaled breath fingerprints and volatile organic compounds in COPD. *COPD Research and Practice* 1 (1): 1-8
128. Hübschmann H.-J. (2015) Handbook of GC-MS: fundamentals and applications. 3rd Edition Wiley-VCH Verlag, Weinheim/ Deutschland
129. Mendis S., Sobotka P. A. and Euler D. E. (1994) Pentane and isoprene in expired air from humans - gas-chromatographic analysis of single-breath. *Clinical Chemistry* 40 (8): 1485-1488
130. Conkle J. P., Camp B. J. and Welch B. E. (1975) Trace composition of human respiratory gas. *Archives of Environmental Health* 30 (6): 290-295
131. Pawliszyn J. (2012) Handbook of solid phase microextraction. 1st edition Elsevier, London/ Great Britain
132. Chen X., Cao M. F., Li Y., Hu W. J., Wang P., Ying K. J. and Pan H. M. (2005) A study of an electronic nose for detection of lung cancer based on a virtual SAW gas sensors array and imaging recognition method. *Measurement Science & Technology* 16 (8): 1535-1546

133. Rudnicka J., Walczak M., Kowalkowski T., Jezierski T. and Buszewski B. (2014) Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography-mass spectrometry versus trained dogs. *Sensors and Actuators B-Chemical* 202: 615-621
134. Mills G. A. and Walker V. (2000) Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A* 902 (1): 267-287
135. Baltussen H. A. (2000) New concepts in sorption based sample preparation for chromatography. Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr/ Deutschland
136. Gordon S. M., Szidon J. P., Krotoszynski B. K., Gibbons R. D. and Oneill H. J. (1985) Volatile organic-compounds in exhaled air from patients with lung-cancer. *Clinical Chemistry* 31 (8): 1278-1282
137. Schubert J. K. and Geiger K. (1999) Bedeutung und Perspektiven der Atemgasanalytik. *Anesthesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie* 34 (7): 391-395
138. Munson M. S. B. and Field F. H. (1966) Chemical ionization mass spectrometry. I. General Introduction. *Journal of the American Chemical Society* 88 (12): 2621-2630
139. Smith D. and Spanel P. (2015) SIFT-MS and FA-MS methods for ambient gas phase analysis: developments and applications in the UK. *Analyst* 140 (8): 2573-2591
140. Baumbach J. I. (2009) Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath. *Journal of Breath Research* 3 (3): 034001
141. Blake R. S., Monks P. S. and Ellis A. M. (2009) Proton-transfer reaction mass spectrometry. *Chemical Reviews* 109 (3): 861-896
142. Bijland L. R., Bomers M. K. and Smulders Y. M. (2013) Smelling the diagnosis: a review on the use of scent in diagnosing disease. *Neth J Med* 71 (6): 300-307
143. Sun X., Shao K. and Wang T. (2015) Detection of volatile organic compounds (VOCs) from exhaled breath as noninvasive methods for cancer diagnosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (11): 2759-2780
144. Haick H., Broza Y. Y., Mochalski P., Ruzsanyi V. and Amann A. (2014) Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chemical Society Reviews* 43 (5): 1423-1449
145. Brown S. D., Tauler R. and Walczak B. (2009) Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis. 1st edition Elsevier, London/ Great Britain
146. Acock A. C. (2005) Working with missing values. *Journal of Marriage and Family* 67 (4): 1012-1028
147. Romesburg C. H. (2004) Cluster analysis for researchers. LuLu Press, North Carolina
148. Student (1908) The probable error of a mean. *Biometrika* 6: 1-25
149. Handa H., Usuba A., Maddula S., Baumbach J. I., Mineshita M. and Miyazawa T. (2014) Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry. *Plos One* 9 (12): e114555
150. Ma H., Li X., Chen J., Wang H., Cheng T., Chen K. and Xu S. (2014) Analysis of human breath samples of lung cancer patients and healthy controls with solid-phase microextraction (SPME) and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC). *Analytical Methods* 6 (17): 6841-6849
151. Miekisch W., Herbig J. and Schubert J. K. (2012) Data interpretation in breath biomarker research: pitfalls and directions. *Journal of Breath Research* 6 (3): 036007
152. Weber E. (1974) Einführung in die Faktorenanalyse. Gustav Fischer Verlag, Jena/ Deutschland
153. Sinues P. M. L., Kohler M. and Zenobi R. (2013) Human breath analysis may support the existence of individual metabolic phenotypes. *Plos One* 8 (4): e59909
154. Eckey H.-F., Kosfeld R. and Rengers M. (2002) Multivariate Statistik: Grundlagen - Methoden - Beispiele. 1. Auflage Gabler Verlag, Wiesbaden/ Deutschland

155. Westhoff M., Litterst P., Freitag L., Urfer W., Bader S. and Baumbach J. I. (2009) Ion mobility spectrometry for the detection of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: results of a pilot study. *Thorax* 64 (9): 744-748
156. Garcia R. A., Morales V., Martin S., Vilches E. and Toledano A. (2014) Volatile organic compounds analysis in breath air in healthy volunteers and patients suffering epidermoid laryngeal carcinomas. *Chromatographia* 77 (5-6): 501-509
157. Phillips M., Basa-Dalay V., Bothamley G., Cataneo R. N., Lam P. K., Natividad M. P. R., Schmitt P. and Wai J. (2010) Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 90 (2): 145-151
158. Spanel P., Dryahina K. and Smith D. (2013) A quantitative study of the influence of inhaled compounds on their concentrations in exhaled breath. *Journal of Breath Research* 7 (1): 017106
159. Poli D., Goldoni M., Caglieri A., Ceresa G., Acampa O., Carbognani P., Rusca M. and Corradi M. (2008) Breath analysis in non small cell lung cancer patients after surgical tumour resection. *Acta Biomedica* 79 (supplement 1): 64-72
160. Wu W. S. and Gains V. S. (1993) Determination of Phosgene (Carbonyl Chloride) in Air by High-Performance Liquid-Chromatography with a Dual Selective Detection System. *Analyst* 118 (10): 1285-1287
161. Larroque V., Desauziers V. and Mocho P. (2006) Development of a solid phase microextraction (SPME) method for the sampling of VOC traces in indoor air. *Journal of Environmental Monitoring* 8 (1): 106-111
162. Scott-Thomas A., Epton M. and Chambers S. (2013) Validating a breath collection and analysis system for the new tuberculosis breath test. *Journal of Breath Research* 7 (3): 037108
163. Stone B. G., Besse T. J., Duane W. C., Evans C. D. and Demaster E. G. (1993) Effect of regulating cholesterol-biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* 28 (8): 705-708
164. Taucher J., Hansel A., Jordan A., Fall R., Futrell J. H. and Lindinger W. (1997) Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11 (11): 1230-1234
165. Hyspler R., Crhova S., Gasparic J., Zadak Z., Cizkova M. and Balasova V. (2000) Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 739 (1): 183-190
166. Kinoyama M., Nitta H., Watanabe A. and Ueda H. (2008) Acetone and isoprene concentrations in exhaled breath in healthy subjects. *Journal of Health Science* 54 (4): 471-477
167. Henderson M. J., Karger B. A. and Wrenshall G. A. (1952) Acetone in the breath - a study of acetone exhalation in diabetic and nondiabetic human subjects. *Diabetes* 1 (3): 188-193
168. McCulloch M., Jezierski T., Broffman M., Hubbard A., Turner K. and Janecki T. (2006) Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integrative Cancer Therapies* 5 (1): 30-39
169. Ehmann R., Boedeker E., Friedrich U., Sagert J., Dippon J., Friedel G. and Walles T. (2012) Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: revisiting a puzzling phenomenon. *European Respiratory Journal* 39 (3): 669-676
170. Walczak M., Jezierski T., Gorecka-Bruzda A., Sobczynska M. and Ensminger J. (2012) Impact of individual training parameters and manner of taking breath odor samples on the reliability of canines as cancer screeners. *Journal of Veterinary Behavior-Clinical Applications and Research* 7 (5): 283-294
171. Amundsen T., Sundstrom S., Buvik T., Gederaas O. A. and Haaverstad R. (2014) Can dogs smell lung cancer? First study using exhaled breath and urine screening in unselected patients with suspected lung cancer. *Acta Oncologica* 53 (3): 307-315

172. Fichtner I., Rolff J., Soong R., Hoffmann J., Hammer S., Sommer A., Becker M. and Merk J. (2008) Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clinical Cancer Research* 14 (20): 6456-6468
173. BfR (2011) III. Polyethylen. in: Datenbank Empfehlungen des Bundesinstitut für Risikobewertung zu Materialien für den Lebensmittelkontakt (ehemals Kunststoff-Empfehlungen) Stand vom 01.03.2011. Zu finden unter: <https://bfr.ble.de/kse/faces/resources/pdf/030.pdf;jsessionid=72BF3E892BEEEE0C2F10A96B34570653>; abgerufen am: 22.07.2016
174. Leelaphiwat P., Chonhenchob V., Singh S. P., Kruenate J., Wichai U. and Ong P. K. C. (2012) Transport coefficients of eucalyptol through various polymeric films. *Packaging Technology and Science* 25 (3): 161-172
175. Gholizadeh M., Razavi J. and Mousavi S. A. (2007) Gas permeability measurement in polyethylene and its copolymer films. *Materials & Design* 28 (9): 2528-2532
176. Zimmermann D., Hartmann M., Moyer M. P., Nolte J. and Baumbach J. I. (2007) Determination of volatile products of human colon cell line metabolism by GC/MS analysis. *Metabolomics* 3 (1): 13-17
177. Kwak J., Gallagher M., Ozdener M. H., Wysocki C. J., Goldsmith B. R., Isamah A., Faranda A., Fakharzadeh S. S., Herlyn M., Johnson A. T. C. and Preti G. (2013) Volatile biomarkers from human melanoma cells. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 931: 90-96
178. Bremser W. (2012) Self-consistent reference value estimation. Series on advances in mathematics for applied sciences. Advanced Mathematical and Computational Tools in Metrology and Testing IX. Vol. 84, World Scientific Publisher,
179. Snyder R. and Hedli C. C. (1996) An overview of benzene metabolism. *Environmental Health Perspectives* 104: 1165-1171
180. Low L. K., Meeks J. R. and Mackerer C. R. (1989) Health-effects of the alkylbenzenes. 2. Xylenes. *Toxicology and Industrial Health* 5 (1): 85-105
181. Castell J. V., Donato M. T. and Gomez-Lechon M. J. (2005) Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57: 189-204
182. Turner M. A., Guallar-Hoyas C., Kent A. L., Wilson I. D. and Thomas C. L. P. (2011) Comparison of metabolomic profiles obtained using chemical ionization and electron ionization MS in exhaled breath. *Bioanalysis* 3 (24): 2731-2738
183. Schubert J. K., Miekisch W., Geiger K. and Noldge-Schomburg G. F. E. (2004) Breath analysis in critically ill patients: potential and limitations. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 4 (5): 619-629
184. Phillips M., Cataneo R. N., Greenberg J., Grodman R., Gunawardena R. and Naidu A. (2003) Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. *European Respiratory Journal* 21 (1): 48-51
185. Frampton M. W., Pryor W. A., Cueto R., Cox C., Morrow P. E. and Utell M. J. (1999) Ozone exposure increases aldehydes in epithelial lining fluid in human lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159 (4): 1134-1137
186. Wallace L. A. and Pellizzari E. D. (1987) Personal air exposures and breath concentrations of benzene and other volatile hydrocarbons for smokers and nonsmokers. *Toxicology Letters* 35 (1): 113-116
187. Wallace L. A., Pellizzari E. D., Hartwell T. D., Davis V., Michael L. C. and Whitmore R. W. (1989) The influence of personal activities on exposure to volatile organic-compounds. *Environmental Research* 50 (1): 37-55
188. Phillips M., Cataneo R. N., Greenberg J., Gunawardena R., Naidu A. and Rahbari-Oskoui F. (2000) Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 136 (3): 243-249

189. Dragonieri S., Schot R., Mertens B. J. A., Le Cessie S., Gauw S. A., Spanevello A., Resta O., Willard N. P., Vink T. J., Rabe K. F., Bel E. H. and Sterk P. J. (2007) An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (4): 856-862
190. Peng G., Hakim M., Broza Y. Y., Billan S., Abdah-Bortnyak R., Kuten A., Tisch U. and Haick H. (2010) Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *British Journal of Cancer* 103 (4): 542-551
191. Funk W., Dammann V. and Donnevert G. (2005) Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. 2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage Wiley-VCH Verlag Weinheim/Deutschland
192. Morita S., Snider M. T. and Inada Y. (1986) Increased n-pentane excretion in humans - a consequence of pulmonary oxygen exposure. *Anesthesiology* 64 (6): 730-733
193. Wispe J. R., Bell E. F. and Roberts R. J. (1985) Assessment of lipid-peroxidation in newborn-infants and rabbits by measurements of expired ethane and pentane - influence of parenteral lipid infusion. *Pediatric Research* 19 (4): 374-379
194. Pincemail J., Camus G., Roesgen A., Dreezen E., Bertrand Y., Lismonde M., Debydupont G. and Deby C. (1990) Exercise induces pentane production and neutrophil activation in humans - effect of propranolol. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 61 (3-4): 319-322
195. Springfield J. R. and Levitt M. D. (1994) Pitfalls in the use of breath pentane measurements to assess lipid-peroxidation. *Journal of Lipid Research* 35 (8): 1497-1504
196. Jordan A., Hansel A., Holzinger R. and Lindinger W. (1995) Acetonitrile and benzene in the breath of smokers and nonsmokers investigated by proton-transfer reaction mass-spectrometry (PTR-MS). *International Journal of Mass Spectrometry* 148 (1-2): L1-L3
197. Gordon S. M., Wallace L. A., Brinkman M. C., Callahan P. J. and Kenny D. V. (2002) Volatile organic compounds as breath biomarkers for active and passive smoking. *Environmental Health Perspectives* 110 (7): 689-698
198. Jareno-Esteban J. J., Munoz-Lucas M. A., Carrillo-Aranda B., Maldonado-Sanz J. A., de Granda-Orive I., Aguilar-Ros A., Civera-Tejuca C., Gutierrez-Ortega C. and Callol-Sanchez L. M. (2013) Volatile organic compounds in exhaled breath in a healthy population: effect of tobacco smoking. *Archivos De Bronconeumologia* 49 (11): 457-461
199. Filipiak W., Ruzsanyi V., Mochalski P., Filipiak A., Bajtarevic A., Ager C., Denz H., Hilbe W., Jamnig H., Hackl M., Dzien A. and Amann A. (2012) Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors, smoking habits and exposure to air pollutants. *Journal of Breath Research* 6 (3): 036008
200. Ueta I., Saito Y., Teraoka K., Miura T. and Jinno K. (2010) Determination of volatile organic compounds for a systematic evaluation of third-hand smoking. *Analytical Sciences* 26 (5): 569-574
201. Philippe R. J. and Hobbs M. E. (1956) Some components of the gas phase of cigarette smoke. *Analytical Chemistry* 28 (12): 2002-2006
202. ATSDR (2007) Toxicological profile for benzene, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services
203. Blomberg L. and Widmark G. (1975) Separation of fresh tobacco-smoke on a packed polar gas-chromatographic column prior to online analysis by gas chromatography mass spectrometry using a nonpolar capillary column. *Journal of Chromatography* 106 (1): 59-71
204. Olson C. T., Yu K. O., Hobson D. W. and Serve M. P. (1986) The metabolism of normal-octane in Fischer-344 rats. *Toxicology Letters* 31 (2): 147-150
205. Toftgard R., Haaparanta T., Eng L. and Halpert J. (1986) Rat lung and liver microsomal cytochrome-P-450 isozymes involved in the hydroxylation of normal-hexane. *Biochemical Pharmacology* 35 (21): 3733-3738
206. Ayala M. and Torres E. (2004) Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. *Applied Catalysis A-General* 272 (1-2): 1-13

207. Svensson S., Some M., Lundsjo A., Helander A., Cronholm T. and Hoog J. O. (1999) Activities of human alcohol dehydrogenases in the metabolic pathways of ethanol and serotonin. *European Journal of Biochemistry* 262 (2): 324-329
208. Filipiak W., Sponring A., Baur M. M., Ager C., Filipiak A., Wiesenhofer H., Nagl M., Troppmair J. and Amann A. (2012) Characterization of volatile metabolites taken up by or released from *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by using GC-MS. *Microbiology* 158: 3044-3053
209. Filipiak W., Beer R., Sponring A., Filipiak A., Ager C., Schiefecker A., Lanthaler S., Helbok R., Nagl M., Troppmair J. and Amann A. (2015) Breath analysis for in vivo detection of pathogens related to ventilator-associated pneumonia in intensive care patients: a prospective pilot study. *Journal of Breath Research* 9 (1): 016004
210. Filipiak W., Sponring A., Baur M. M., Filipiak A., Ager C., Wiesenhofer H., Nagl M., Troppmair J. and Amann A. (2012) Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 12: 113
211. Boumba V. A., Economou V., Kourkoumelis N., Gousia P., Papadopoulou C. and Vougiouklakis T. (2012) Microbial ethanol production: experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Science International* 215 (1-3): 189-198
212. Ehrig T., Bohren K. M., Wermuth B. and Vonwartburg J. P. (1988) Degradation of aliphatic-alcohols by human-liver alcohol-dehydrogenase - effect of ethanol and pharmacokinetic implications *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 12 (6): 789-794
213. Bortoletto A. M. and Alcarde A. R. (2015) Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachacas. *Food Control* 54: 1-6
214. Divincenzo G. D., Kaplan C. J. and Dedinas J. (1976) Characterization of metabolites of methyl n-butyl ketone, methyl iso-butyl ketone, and methyl ethyl ketone in guinea-pig serum and their clearance. *Toxicology and Applied Pharmacology* 36 (3): 511-522
215. Dietz F. K. and Traiger G. J. (1979) Potentiation of CCl₄ of hepatotoxicity in rats by a metabolite of 2-butanone - 2,3-butanediol. *Toxicology* 14 (3): 209-215
216. Wlodzimirow K. A., Abu-Hanna A., Schultz M. J., Maas M. A. W., Bos L. D. J., Sterk P. J., Knobel H. H., Soers R. J. T. and Chamuleau R. (2014) Exhaled breath analysis with electronic nose technology for detection of acute liver failure in rats. *Biosensors & Bioelectronics* 53: 129-134
217. Hoell D., Mensing T., Roggenbuck R., Sakuth M., Sperlich E., Urban T., Neier W. and Strehlke G. (2000) 2-Butanone. in *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*Wiley-VCH Verlag: Weinheim/ Deutschland
218. Barrera G. (2012) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology* 2012: 137289
219. Chan H. P., Lewis C. and Thomas P. S. (2010) Oxidative stress and exhaled breath analysis: a promising tool for detection of lung cancer. *Cancers* 2 (1): 32-42
220. Pryor W. A., Das B. and Church D. F. (1991) The ozonation of unsaturated fatty-acids - aldehydes and hydrogen-peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 4 (3): 341-348
221. Orhan H., Van Holland B., Krab B., Moeken J., Vermeulen N. P. E., Hollander P. and Meerman J. H. N. (2004) Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: Increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radical Research* 38 (12): 1269-1279
222. Corradi M., Pignatti P., Manini P., Andreoli R., Goldoni M., Poppa M., Moscato G., Balbi B. and Mutti A. (2004) Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *European Respiratory Journal* 24 (6): 1011-1017
223. Chippendale T. W. E., Gilchrist F. J., Spanel P., Alcock A., Lenney W. and Smith D. (2014) Quantification by SIFT-MS of volatile compounds emitted by *Aspergillus fumigatus* cultures

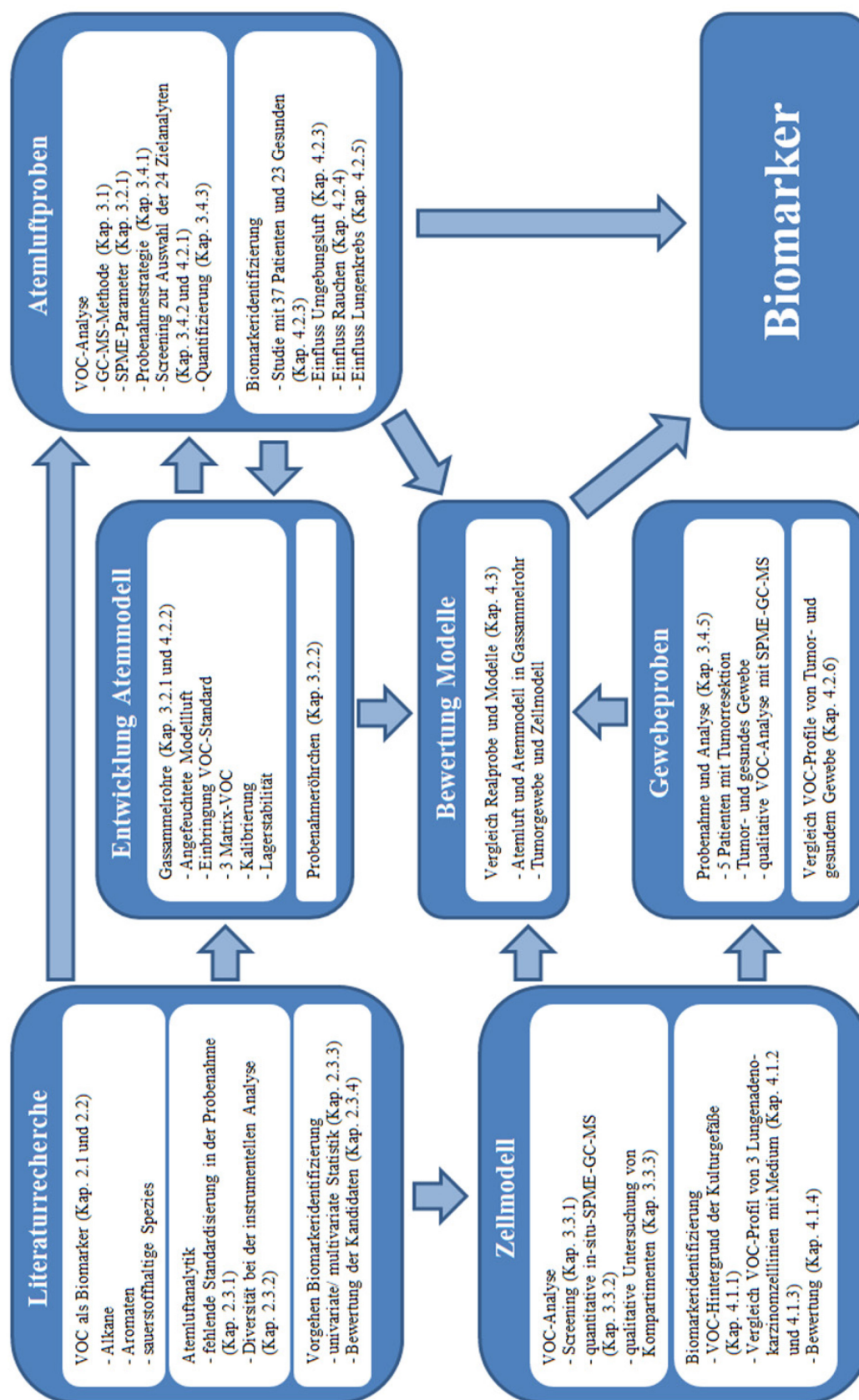
- and in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Analytical Methods* 6 (20): 8154-8164
224. Chippendale T. W. E., Gilchrist F. J., Spanel P., Alcock A., Lenney W. and Smith D. (2014) Quantification by SIFT-MS of volatile compounds emitted by in vitro cultures of *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae* isolated from patients with respiratory diseases. *Analytical Methods* 6 (8): 2460-2472
 225. Gao J. P., Zou Y. C., Wang Y. G., Wang F., Lang L., Wang P., Zhou Y. and Ying K. J. (2016) Breath analysis for noninvasively differentiating *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia from its respiratory tract colonization of ventilated patients. *Journal of Breath Research* 10 (2): 027102
 226. Baranska A., Mujagic Z., Smolinska A., Dallinga J. W., Jonkers D. M. A. E., Tigchelaar E. F., Dekens J., Zhernakova A., Ludwig T., Masclee A. A. M., Wijmenga C. and van Schooten F. J. (2016) Volatile organic compounds in breath as markers for irritable bowel syndrome: a metabolomic approach. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 44 (1): 45-56
 227. Ellis C. K., Stahl R. S., Nol P., Waters W. R., Palmer M. V., Rhyan J. C., VerCauteren K. C., McCollum M. and Salman M. D. (2014) A pilot study exploring the use of breath analysis to differentiate healthy cattle from cattle experimentally infected with *mycobacterium bovis*. *Plos One* 9 (2): e89280
 228. Wang C. S., Feng Y., Wang M. G., Pi X., Tong H. S., Wang Y., Zhu L. and Li E. Y. (2015) Volatile organic metabolites identify patients with mesangial proliferative glomerulonephritis, IgA nephropathy and normal controls. *Scientific Reports* 5: 14744
 229. Broza Y. Y., Kremer R., Tisch U., Gevorkyan A., Shiban A., Best L. A. and Haick H. (2013) A nanomaterial-based breath test for short-term follow-up after lung tumor resection. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 9 (1): 15-21
 230. Walker D. B., Walker J. C., Cavnar P. J., Taylor J. L., Pickel D. H., Hall S. B. and Suarez J. C. (2006) Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. *Applied Animal Behaviour Science* 97 (2-4): 241-254
 231. Dundee J. W. (1979) New i.v. anesthetics *British Journal of Anaesthesia* 51 (7): 641-648
 232. Miekisch W., Fuchs P., Kamysek S., Neumann C. and Schubert J. K. (2008) Assessment of propofol concentrations in human breath and blood by means of HS-SPME-GC-MS. *Clinica Chimica Acta* 395 (1-2): 32-37
 233. IARC (1999) gamma-Butyrolakton. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen Peroxide* 71: 367-382
 234. Corkery J. M., Loi B., Claridge H., Goodair C., Corazza O., Elliott S. and Schifano F. (2015) Gamma hydroxybutyrate (GHB), gamma butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD; BDO): a literature review with a focus on UK fatalities related to non-medical use. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 53: 52-78
 235. Kuban P. and Foret F. (2013) Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Analytica Chimica Acta* 805: 1-18
 236. Grundmann A. (2005) Grundlegende Studie zur Eignung von Atemluft als Diagnosematrix. Wissenschaftliche Abschlussarbeit zur Erlangung des Titels Doktor rerum naturalium, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund
 237. Hickman J. A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M. and van der Kuip H. (2014) Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnology Journal* 9 (9): 1115-1128
 238. Sharma S. V., Haber D. A. and Settleman J. (2010) Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* 10 (4): 241-253
 239. Dement J. M., Hensley L. and Gitelman A. (1997) Carcinogenicity of gasoline: a review of epidemiological evidence. *Preventive Strategies for Living in a Chemical World* 837: 53-76

240. Yoel U., Gopas J., Ozer J., Peleg R. and Shvartzman P. (2015) Canine scent detection of volatile elements, characteristic of malignant cells, in cell cultures. *Israel Medical Association Journal* 17 (9): 567-570
241. Strauch M., Ludke A., Munch D., Laudes T., Galizia C. G., Martinelli E., Lavra L., Paolesse R., Ulivieri A., Catini A., Capuano R. and Di Natale C. (2014) More than apples and oranges - detecting cancer with a fruit fly's antenna. *Scientific Reports* 4: 3576
242. Cremer D. R. and Eichner K. (2000) The influence of the pH value on the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *European Food Research and Technology* 211 (4): 247-251
243. Even M. (2015) Research internship report: Chemical analysis and application study of an odor reference material based on plants. Internship during Master study, Chimie Paris Tech.
244. Schroeder W. (2015) Volatile S-nitrosothiols and the typical smell of cancer. *Journal of Breath Research* 9 (1): 016010
245. Halama K. (2015) Spektroskopische Verfahren zur Charakterisierung von Nitrosothiolen. Wissenschaftliche Abschlussarbeit zur Erlangung des Titels Diplom-Lebensmittelchemiker, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin
246. Csoma Z., Bush A., Wilson N. M., Donnelly L., Balint B., Barnes P. J. and Kharitonov S. A. (2003) Nitric oxide metabolites are not reduced in exhaled breath condensate of patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest* 124 (2): 633-638
247. Kallinowski F., Schlenger K. H., Runkel S., Kloes M., Stohrer M., Okunieff P. and Vaupel P. (1989) Blood-flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth-rate of human-tumor xenografts. *Cancer Research* 49 (14): 3759-3764
248. Thamm I. (2013) Krebsmarker in der Atemluft. Wissenschaftliche Abschlussarbeit zur Erlangung des Titels Diplom-Chemikerin, Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin

Quellenverzeichnis für Abbildungen

Abbildung 14	Abteilung Z.8, BAM
Abbildung 19	Irene Thamm, BAM [248]
Abbildung 20	Abteilung Z.8, BAM
Abbildung 21, Nr. 2-4	Irene Thamm, BAM [248]
Mikroskopische Aufnahmen, S. 40	Jana Rolff, EPO GmbH
Abbildung 28	Dominic Ammann, BAM
Abbildung 29	Dominic Ammann, BAM
Abbildung 30	Dominic Ammann, BAM
Abbildung 36	Dominic Ammann, BAM
Abbildung 37	Dominic Ammann, BAM
Abbildung 40	Abteilung Z.8, BAM
Abbildung 41	Abteilung Z.8, BAM
Abbildung 42	Ramona Metta, Charité
Abbildung 43	Ramona Metta, Charité

A Anhang



Anhang Abbildung 1: Ausführliche Übersichtsgrafik mit Kapitelverweisen

A.1 Chemikalien und Geräte

Anhang Tabelle 1: Liste der verwendeten Standardsubstanzen

Substanz	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Aceton	picograde	LGC Standards, Wesel/ DE
Acetonitril	HiPerSolv	VWR, Darmstadt/ DE
Acetophenon	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Benzen	99,7 %	Merck, Darmstadt/ DE
2,3-Butadion	97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Butanal	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
1-Butanol	ACS reagent	Merck, Darmstadt/ DE
2-Butanol	99 %	Merck, Darmstadt/ DE
t-Butanol	≥99,7 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Butanon	99 %	Alfa Aesar, Karlsruhe/ DE
1-Butanthiol	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Butylacetat	99,5 %	Merck, Darmstadt/ DE
Cumen	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Cyclohexan	picograde	LGC Standards, Wesel/ DE
Cyclohexanol	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Cyclohexanon	≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Dekan	≥99,8 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Dekanal	96 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
N,N-Dimethylformamid	≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2,4-Dimethylheptan	98 %	aber GmbH, Karlsruhe/ DE
2,4-Dimethyl-1-hepten	98 %	aber GmbH, Karlsruhe/ DE
n-Dodekan	≥99,8 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Essigsäure	≥99,7 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Ethanol	optigrade	LGC Standards, Wesel/ DE
Ethylacetat	picograde	LGC Standards, Wesel/ DE
Ethylbenzen	≥99 %	Merck, Darmstadt/ DE
Ethylbutyrat	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Ethyl-1-hexanol	≥99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
1-Ethyl-2-methylbenzen	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
1-Ethyl-3-methylbenzen	99 %	aber GmbH, Karlsruhe/ DE
1-Ethyl-4-methylbenzen	97 %	Alfa Aesar, Karlsruhe/ DE
Furan	≥99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Heptan	picograde	LGC Standards, Wesel/ DE
n-Heptanal	97 %	aber GmbH, Karlsruhe/ DE
n-Hexan	picograde	LGC Standards, Wesel/ DE
n-Hexanal	98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Hexanal-D ₁₂	98,8 %	C/D/N Isotopes Inc., Quebec/ CAN
1-Hexanol	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
1-Hexanol-D ₁₃	98,7 %	C/D/N Isotopes Inc., Quebec/ CAN
2-Hexanon	98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Hexanon	96 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Isopren	99,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg/ DE
Mesitylen	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Methylbutan	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Methylbutanal	≥98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE

Anhang Tabelle 1 (Fortsetzung): Liste der verwendeten Standardsubstanzen

Substanz	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
2-Methyl-1-butanol	98 %	Alfa Aesar, Karlsruhe/ DE
3-Methyl-1-butanol	99 %	Alfa Aesar, Karlsruhe/ DE
2-Methyl-2-butenal	97 %	Alfa Aesar, Karlsruhe/ DE
Methylcyclopentan	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Methylheptan	98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Methylhexan	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Methylhexan	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Methylnonan	98 %	abcr GmbH, Karlsruhe/ DE
2-Methylpentan	≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Methylpentan	≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Methyl-1-penten	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Methyl-2-propanol	≥99,7 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Methyl-2-propenal	95 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Methylundekan	98 %	abcr GmbH, Karlsruhe/ DE
n-Nonan	99,9 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Nonanal	95 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Oktan	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Oktan-D ₁₈	99,4 %	C/D/N Isotopes Inc., Quebec/ CAN
n-Oktanal	99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
2-Oktanon	≥99,7 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
n-Pentan	picograde	LGC Standards, Wesel/ DE
n-Pentanal	97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
1-Pentanol	≥98 %	Alfa Aesar, Karlsruhe/ DE
2-Pentanon	99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Pentanon	≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
3-Pentanon-D ₁₀	99,4 %	C/D/N Isotopes Inc., Quebec/ CAN
Phenol	99,5 %	LGC Standards, Wesel/ DE
Propanal	97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
1-Propanol	99,5 %	Merck, Darmstadt/ DE
2-Propanol	optigrade	LGC Standards, Wesel/ DE
n-Propylbenzen	≥99,0 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Pyrrol	99,5 %	LGC Standards, Wesel/ DE
Styren	99,5 %	LGC Standards, Wesel/ DE
n-Tetradekan	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Tetrahydrofuran	per analysis	Merck, Darmstadt/ DE
Toluol	picograde	LGC Standards, Wesel/ DE
Toluol-D ₈	99,6 %	C/D/N Isotopes Inc., Quebec/ CAN
n-Tridekan	analytical standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Trifluoressigsäure	≥99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
1,2,3-Trimethylbenzen	91 %	LGC Standards, Wesel/ DE
1,2,4-Trimethylbenzen	99 %	LGC Standards, Wesel/ DE
m-Xylen	≥99 %	Merck, Darmstadt/ DE
o-Xylen	≥99 %	Merck, Darmstadt/ DE
p-Xylen	≥99 %	Merck, Darmstadt/ DE

Anhang Tabelle 2: Liste der eingesetzten sonstigen Chemikalien

Chemikalie	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Aktivkohlegranulat	mesh 20-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Argon	5.0	Air Liquide, Berlin/ DE
Desinfektionslösung Korsolex® extra		BODE Chemie, Hamburg/ DE
fetales Kälberserum		Biochrom GmbH, Berlin/ DE
Helium	5.0	Air Liquide, Berlin/ DE
Methanol	für VOC-Analyse ≥99,9 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Nährmedium DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin		Biochrom GmbH, Berlin/ DE
Nährmedium Ham's F12 mit L-Glutamin		Biochrom GmbH, Berlin/ DE
Reinigungslösung Bodedex® forte		BODE Chemie, Hamburg/ DE
Stickstoff	5.0	Air Liquide, Berlin/ DE
synthetische Luft		Air Liquide, Berlin / DE
Trockeneis		EPO GmbH, Berlin/ DE
Wasser	zweifach entionisiert	MilliQ-Anlage, hausintern

Anhang Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Bezugsquelle
Analysenwaage	AT261	Mettler Toledo, Gießen/ DE
Autosampler	MSP-2xl	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
Brutschrank	Inkubator C200	Labotect GmbH, Göttingen/ DE
Gaschromatograph	GC 7980A	Agilent Technologies, Waldbronn/ DE
Massenspektrometer	MS 5960C	Agilent Technologies, Waldbronn/ DE
Mess-Datenlogger	Voltcraft DL120-TH	Conrad Electronic AG, Wollerau/ CH
Milli-Q Anlage	Gradient system	Merck Millipore, Darmstadt/ DE
Muffelofen	B150	Nabertherm GmbH, Lilienthal/ DE
Rotameter	bis 150 mL·min ⁻¹	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Spirometer	SpiroScout	Ganshorn Medizin Electronic GmbH, Niederlauer/ DE
Trockenschrank		Memmert GmbH, Schwabach/ DE

Anhang Tabelle 4: Liste der Materialien für Probenahme und Probenvorbereitung

Material	Bezugsquelle
Adapter aus Polyethylen	BAM Werkstatt, Berlin/ DE
Gassammelrohr – Mundstück	
Probenahmeröhrchen – Mundstück	
Probenahmeröhrchen – Spirometer	
Aluminiumkoffer mit Füllmaterial	Embags Hamburg GmbH, Hamburg/ DE
Bördelkappe Butyl-PTFE 1,3 mm, 55° ShoreA	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
Bördelkappe Silikon/PTFE 1,5 mm, 55° ShoreA	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
Certain®-Flaschen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Einschweißgerät inkl. Folie	BERGER Betriebseinrichtungen, Berlin/ DE
Feingewindeial 20 mL	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
Adsorberröhrchen	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
Carbopack B/X	
PDMS-Granulat	
PDMS-Schaum	
Tenax GR	
Tenax TA	

Anhang Tabelle 4 (Fortsetzung): Liste der Materialien für Probenahme und Probenvorbereitung

Material	Bezugsquelle
Gassammelrohr	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Modifikation mit GL14-Gewinden	Glasbläserei Horst Müller, Berlin/ DE
GC-Kapillarsäulen	Agilent Technologies, Waldbronn/ DE
VF-624ms, 60m x 0,32mm x 1,8µm	
CP PoraBOND Q, 25m x 0,25mm x 3µm	
HP-VOC, 60m x 0,32mm x 1,8µm	
Glasrohre (Länge 15 cm, beidseitig mit GL25-Gewinde)	Gassner Glastechnik GmbH, München/ DE
Glasspritze, gasdicht, 10 µL und 25 mL	SGE Analytical Science, Milton Keynes/ GB
Kanülen, Fine-Ject® 20 mm	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen/ DE
Kanülen, 115 mm	SGE Analytical Science, Milton Keynes/ GB
Kunststoffbecher	
Kulturröhrchen (12x100 mm) mit PP-Kappe	Brand GmbH + Co KG, Wertheim/ DE
Laborverschraubungen aus PTFE und ETFE	Bohlender GmbH, Grünfeld/ DE
Mundstücke	air safety Ltd., Morecambe/ GB
NMR-Röhrchen ST500-7 Standard 5mm	Norell Inc., Marion/ USA
Polypropylenvlies, asota® olefin hydrophil	ASOTA GmbH, Linz/ A
Polypropylenvlies, asota® olefin hydrophob	ASOTA GmbH, Linz/ A
PBTP-Schraubgewindekappen mit Apertur, rot	Bohlender GmbH, Grünfeld/ DE
PBTP-Schraubgewindevollkappen mit Silikon/ PTFE-Dichtung, rot	Bohlender GmbH, Grünfeld/ DE
PPS- Schraubgewindekappen mit Apertur, schwarz	Bohlender GmbH, Grünfeld/ DE
PPS-Schraubgewindevollkappen mit Silikon/ PTFE-Dichtung, schwarz	Bohlender GmbH, Grünfeld/ DE
Schraubkappe Butyl-PTFE 1,6 mm, 55° ShoreA	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
Schraubkappe Silikon/PTFE 1,5 mm, 55° ShoreA	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
Septumkappe für Kulturflasche	TPP GmbH, Trasadingen/ CH
Septum Silikon, 22 mm für GL25	Duran Group GmbH, Mainz/ DE
Septum Silikon/PTFE 24 mm für GL25	Restek GmbH, Bad Homburg/ DE
Septum Silikon/ PTFE 12 mm für GL14	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
SPME-Fasern	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
Car/PDMS 75 µm	
Car/PDMS 85 µm	
DVB/Car/PDMS 50/30 µm	
PA 85 µm	
PDMS 7 µm	
PDMS 30 µm	
PDMS 100 µm	
PDMS/DVB 65 µm	
PEG 60 µm	
SPME Halter, manuell	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/ DE
SPME Halter, automatisch	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
SPME-Rollrandvial 20 mL	Gerstel GmbH, Mülheim a. d. Ruhr/ DE
SPME-Stabilisierungen für Zellkulturflasche aus PTFE	BAM Werkstatt, Berlin/ DE
SPME-Stabilisierungen für Gassammelrohr aus PTFE	BAM Werkstatt, Berlin/ DE
SPME-Stabilisierungen für Headspacevials aus PTFE	BAM Werkstatt, Berlin/ DE
Stanzgerät HK 800 Economy	Berg & Schmid GmbH, Remseck/ DE
Stanzwerkzeug (70 x 43 mm, eckig und abgerundet)	BAM Werkstatt, Berlin/ DE
Zellkulturflasche T150 mit Filterkappen	TPP GmbH, Trasadingen/ CH

Anhang Tabelle 5: Bezugsquellen der Lungenadenokarzinomzelllinien

Material	Bezugsquelle
humane Lungenadenokarzinomzelllinie A549	ATCC, Manassas, Virginia/ USA
humane Lungenadenokarzinomzelllinie Lu7387	EPO GmbH, Berlin-Buch/ DE
humane Lungenadenokarzinomzelllinie Lu7466	EPO GmbH, Berlin-Buch/ DE

Anhang Tabelle 6: Details zu eingesetzter Software

Bezeichnung	Version
MS Excel 2010	14.0.7159.5000 (32-Bit)
OriginPro	2015G (64-bit) Sr2
MSD ChemStation Data Analysis	G1701EA E.02.00.493
NIST Mass Spectral Search Program	Version 2.0a
Statist	2.0 rev. 4c

A.2 Ergänzungen zur HS-SPME-GC-MS-Methodenentwicklung

Erste Optimierung der GC-Methode: Variation des Ofenprogramms (Ergänzung zu Kapitel 3.1)

Die Herstellung der Standards zur Optimierung des Ofenprogramms erfolgte durch Pipettieren von je 20 µL der in Anhang Tabelle 7 gelisteten Substanzen in 1 mL-Maßkolben und Auffüllen mit Toluol bzw. Methanol. Anschließend wurden diese Stammlösungen volumetrisch 1:50 mit dem jeweiligen Lösungsmittel verdünnt. Die Verwendung von zwei Lösungsmitteln war notwendig, da durch die Elution des Lösungsmittels jeweils ein bestimmter Retentionszeitbereich durch ein breites Lösungsmittelsignal nicht ausgewertet werden konnte.

Anhang Tabelle 7: Qualitative Zusammensetzung des Standardgemisches mit 24 VOC in Toluol (A) und des Standardgemisches mit 17 VOC in Methanol (B) für die erste Optimierung der GC-Methode; Ergänzung zu Kapitel 3.1

A: Standardgemisch in Toluol			
n-Butanal	Ethanol	n-Hexan	Aceton
n-Pentanal	1-Propanol	n-Heptan	2-Butanon
3-Methylbutanal	2-Propanol	2-Methylpentan	2-Pentanon
Benzen	1-Butanol	3-Methylpentan	3-Pentanon
Furan	2-Butanol	Cyclohexan	2,3-Butadion
Tetrahydrofuran	Ethylacetat	Isopren	Acetonitril
B: Standardgemisch in Methanol			
n-Hexanal	2-Hexanon	n-Butylacetat	Toluol
n-Heptanal	3-Hexanon	n-Heptan	N,N-Dimethylformamid
n-Oktanal	1-Pentanol	n-Oktan	
n-Nonanal	2-Methyl-1-butanol	n-Nonan	
n-Dekanal	3-Methyl-1-butanol	n-Dekan	

Eine vollständige Übersicht der während der ersten Optimierung des Ofenprogramms angewendeten GC-MS-Parameter ist in Anhang Tabelle 8 gegeben. Der „Solvent-Delay“ war für die methanolische Lösung 9,2 min und der „Detector-Off“ war für die Toluollösungen 20 min. Die Zuordnung der Signale erfolgte über NIST-Datenbankabgleich der MS-Spektren sowie Retentionszeit- und Spektrenvergleich mit authentischen Substanzen.

Anhang Tabelle 8: GC-MS-Parameter während der ersten Methodenoptimierung; Ergänzung zu Kapitel 3.1

GC-Parameter	
Injektion	Splitless
Injektionsvolumen	2 µL
Injektortemperatur	280 °C
Trärgas	Helium 5.0
Gasfluss	1 mL·min ⁻¹
Säule	VF-624ms, 60 m x 0,32 mm x 1,8 µm
Ofenprogramm	Tabelle 3, s. Seite 21
Temperatur Transferline	280 °C
MS-Parameter	
Ionisationsart	EI positiv
Ionisierungsenergie	70 eV
Quellentemperatur	230 °C
Quadrupoltemperatur	150 °C
Detektionsmodus	Scan (m/z 35-300 u)

Zweite Optimierung der GC-Methode: Vergleich verschiedener GC-Säulen

Für die zweite Optimierung der GC-Bedingungen kamen 76 native Standardsubstanzen und fünf deuterierte Verbindungen zum Einsatz. Die nativen VOC wurden in einer gemeinsamen Lösung vereint (Anhang Tabelle 9) und die isotopenmarkierten Stoffe in einer zweiten (Anhang Tabelle 10). Als Lösungsmittel wurde Methanol eingesetzt. Die Standardherstellung erfolgte gravimetrisch kontrolliert in Maßkolben.

Anhang Tabelle 9: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ für 76 native VOC in methanolischem Standardgemisch für die zweite Optimierung der GC-Bedingungen; Ergänzung zu Kapitel 3.1

Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
n-Pentan	98,0	n-Nonanal	1,8
n-Hexan	19,8	n-Dekanal	2,0
n-Heptan	8,8	2-Methylpropanal	9,8
n-Oktan	4,8	3-Methylbutanal	8,6
n-Nonan	4,2	2-Methyl-2-propenal	9,7
n-Dekan	1,7	t-2-Methyl-2-butenal	1,8
2-Methylbutan	64,2	Aceton	9,6
2-Methylpentan	78,6	2-Butanon	10,0
3-Methylpentan	78,7	2-Pentanon	7,6
2-Methylhexan	10,6	2-Hexanon	5,6
3-Methylhexan	12,9	2-Oktanon	1,8
3-Methylheptan	4,8	3-Pentanon	5,2
3-Methylnonan	1,8	3-Hexanon	5,0
3-Methylundekan	1,7	Cyclohexanon	14,9
2,4-Dimethylheptan	4,3	Ethylacetat	11,3
Cyclohexan	53,1	n-Butylacetat	5,6
Methylcyclopentan	41,2	n-Propylpropionat	6,9
n-Undekan	1,1	Ethylbutyrat	5,6
n-Dodekan	0,9	γ -Butyrolakton	8,1
n-Tridekan	1,2	Benzen	4,8
n-Tetradekan	1,1	Toluen	1,7
2-Methyl-1-penten	16,8	o-Xylen	1,9
2,4-Dimethyl-1-hepten	5,1	m-Xylen	1,7
Isopren	11,5	p-Xylen	1,3
Ethanol	119,4	Ethylbenzen	1,6
1-Propanol	29,9	Styren	2,0
2-Propanol	27,3	Cumen	2,0
1-Butanol	11,2	n-Propylbenzen	2,1
2-Methyl-1-propanol	24,1	1-Ethyl-2-methylbenzen	2,1
2-Methyl-2-propanol	100,4	1-Ethyl-3-methylbenzen	1,9
2-Ethyl-1-hexanol	2,5	1-Ethyl-4-methylbenzen	1,8
Cyclohexanol	6,4	1,2,3-Trimethylbenzen	1,7
Propanal	3,0	1,2,4-Trimethylbenzen	1,4
n-Butanal	9,7	Mesitylen	1,4
n-Pentanal	3,3	Acetophenon	2,0
n-Hexanal	6,9	Phenol	1,9
n-Heptanal	1,4	Benzaldehyd	2,6
n-Oktanal	1,8	Pyrrol	2,2

Anhang Tabelle 10: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ für fünf deuterierte VOC in methanolischem Standardgemisch für die zweite Optimierung der GC-Bedingungen; Ergänzung zu Kapitel 3.1

Substanz	Konzentration
3-Pentanon-D ₁₀	10,4
Oktan-D ₁₈	1,8
Toluen-D ₈	4,5
Hexanal-D ₁₂	11,4
Hexanol-D ₁₃	10,1

Für die GC-MS-Analyse wurden 10 µL nativer Standard oder isotopenmarkierter Standard in ein 20 mL-Vial pipettiert und mittels HS-SPME-GC-MS analysiert. Darüber hinaus erfolgten auch Analysen für Einzelstandards und Standards mit geringerer Anzahl an VOC für die Signalzuordnung.

Die Extraktion erfolgte mit einer Car/PDMS Faser (75 µm) für 30 min bei 70 °C. Die Desorption wurde bei 280 °C für 3 min mit geschlossenem Splitventil durchgeführt. Der Injektor war dabei mit einem Merlin MicroSeal® ausgerüstet. Die MS-Detektion erfolgte mit den in Anhang Tabelle 8 angegebenen Parametern. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Datenbankabgleich der MS-Spektren sowie durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit authentischen Substanzen.

Auswahl einer Anreicherungsmethode: Vergleich verschiedener Materialien für DHS und SPME (Ergänzung zu Kapitel 3.1)

Der Vergleich von DHS-Adsorbermaterialien und SPME-Fasern wurde jeweils mit einem Standardgemisch mit 23 VOC in Methanol durchgeführt (Anhang Tabelle 11). Der Einsatz von zwei qualitativ gleichen aber quantitativ unterschiedlichen Standardlösungen begründet sich darin, dass der Vergleich der DHS-Adsorbermaterialien und der SPME-Fasern zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte, die Standardlösung jedoch nicht über diesen Zeitraum stabil war (Konzentrationsänderungen aufgrund unerfahrener Handhabung).

Anhang Tabelle 11: Konzentration in ng·µL⁻¹ für 23 VOC in methanolischen Standardgemischen für die Auswahl einer Anreicherungsmethode; Ergänzung zu Kapitel 3.1

Substanz	Konzentration für		Substanz	Konzentration für	
	Adsorber	SPME		Adsorber	SPME
n-Pentan	50	39	1-Hexanol	71	55
n-Hexan	54	42	2-Methyl-1-butanol	71	55
n-Heptan	56	43	2-Butanon	67	51
n-Oktan	58	45	2-Pentanon	66	51
n-Dekan	59	46	2-Hexanon	67	51
2-Methylpentan	53	41	2,3-Butadion	81	62
Cyclohexan	63	48	n-Butanal	65	51
Isopren	55	43	n-Pentanal	68	53
Toluen	71	55	n-Hexanal	69	53
1-Propanol	69	53	n-Heptanal	69	53
1-Butanol	68	53	n-Oktanal	70	54
1-Pentanol	70	54			

Für den Vergleich der fünf DHS-Adsorbermaterialien erfolgte zunächst die Konditionierung unter N₂-Atmosphäre für 8 h bei unterschiedlichen Temperaturen entsprechend den Herstellerangaben (Anhang Tabelle 12). Je Ansatz wurden 5 µL VOC-Standard (Anhang Tabelle 11) in ein 20 mL-HS-Vials gegeben. Die Überführung des Standards auf die Adsorbermaterialien erfolgte durch DHS nach Inkubation der vorbereiteten Vials (80 °C, 5 min) bei 80 °C mit einem N₂-Strom von 40 mL·min⁻¹ für 15 min. Die Thermodesorption der beladenen Adsorberröhrchen begann mit 35 °C, auf die eine Heizrate von 360 °C·min⁻¹ bis zum Erreichen der Desorptionstemperatur (Anhang Tabelle 12) folgte. Die Endtemperatur wurde so lange gehalten, bis eine Gesamtzeit von 10 min erreicht war. Die Kryofokussierung erfolgte im Kaltaufgabesystem bei -100 °C. Die Desorption wurde mit einer Heizrate von 12 °C·s⁻¹ bis 280 °C und einer sich anschließenden Haltezeit von 10 min durchgeführt.

Anhang Tabelle 12: Konditionierungs- und Desorptionstemperaturen von DHS-Adsorbermaterialien; Ergänzung zu Kapitel 3.1

	Konditionierungstemperatur / °C	Desorptionstemperatur / °C
Tenax TA	280	280
Tenax GR	280	280
PDMS Schaum	260	260
PDMS Granulat	260	260
Carbopack B/X	310	310

Für den Vergleich der neun SPME-Fasern erfolgte zunächst die Konditionierung unter N₂-Atmosphäre entsprechend den Herstellerangaben (Anhang Tabelle 13). Je Ansatz wurden 5 µL VOC-Standard (Anhang Tabelle 11) in ein 20 mL-HS-Vials gegeben. Nach Inkubation der vorbereiteten Vials (70 °C, 5 min) erfolgte die Extraktion für 30 min bei 70 °C bevor die Desorption der SPME-Fasern im Injektor für 1 min mit der in Anhang Tabelle 13 angegebenen Desorptionstemperatur durchgeführt wurde. Vor Beginn der Extraktion und nach der Desorption erfolgte für jede SPME-Faser ein pre- und post-Bakeout von 2 min mit der in Anhang Tabelle 13 angegebenen Bakeout-Temperatur.

Die GC-MS-Methode für beide Versuchsdurchführungen richtete sich nach den aus der ersten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen. Die Signalintensitäten für die Peaks wurden im Total Ion Current (TIC)-Chromatogramm durch manuelle Integration ermittelt. Die Untersuchungen wurden für jedes Material als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Anhang Tabelle 13: Konditionierungsbedingungen, Desorptions- und Bakeout-Temperaturen von SPME-Fasern; Ergänzung zu Kapitel 3.1

	Konditionierungsbedingungen		Desorptionstemperatur /	Bakeout-Temperatur /
	°C	h	°C	°C
Car/PDMS 75 µm	300	1	280	300
Car/PDMS 85 µm	300	1	280	300
PDMS 7 µm	320	1	280	300
PDMS 30 µm	250	½	260	260
PDMS 100 µm	250	½	260	260
PDMS/DVB 65 µm	250	½	240	250
DVB/Car/PDMS 50/30 µm	270	1	250	250
PA 85 µm	280	1	280	300
PEG 60 µm	240	½	240	240

A.3 Ergänzungen zur Modellentwicklung

Modellluft in Gassammelrohren (Ergänzung zu Kapitel 3.2.1)

Die Reinigung der Gassammelrohre erfolgte durch Spülen mit Wasser und anschließend mit Methanol. Nach der Demontage wurde der Glaskörper bei 140 °C für mindestens 8 h ausgeheizt. Währenddessen erfolgte die Behandlung der Teflonhähne mit Methanol für 15 min im Ultraschallbad gefolgt von einer Lufttrocknung. Die Silikon/PTFE-Septen für das mittlere Gewinde kamen ohne Vorbereitung wie vom Hersteller geliefert zum Einsatz. Nach dem Abkühlen der Glaskörper auf Raumtemperatur wurden die Gassammelrohre wieder zusammengesetzt.

Für das Modell der trockenen synthetischen Luft erfolgte das Spülen des Gassammelrohres für 5 min mit synthetischer Luft mit ca. 300 mL·min⁻¹. Für das Modell der angefeuchteten, synthetischen Luft wurde das Gas durch drei wassergefüllte Gaswaschflaschen, davon zwei mit Sinterplatten, durchgeleitet, bevor es für 30 min in das Gassammelrohr einströmte. Der Spülvorgang endete durch Abstellen des Gasstroms gefolgt vom sofortigen Verschließen der Teflonhähne des Gassammelrohres.

Optimierung der SPME-Bedingungen für die Atemluftanalytik in Gassammelrohren (Ergänzung zu Kapitel 3.2.1)

Nach der Vorbereitung des Gassammelrohres folgte das Dotieren von 5 µL des in Anhang Tabelle 15 angegebenen Standardgemisches und eine Equilibrierung für 30 min. Ein manueller Halter mit konditionierter Car/PDMS-Faser (75 µm) wurde durch das Septum in das Gassammelrohr eingebracht. Gegebenenfalls erfolgte eine Temperierung des Gassammelrohres inklusive SPME-Faser im Trockenschrank. Im Anschluss folgte die Desorption der beladenen SPME-Faser bei 280 °C für 1 min. Da nur Aldehyde untersucht wurden, kam die ursprünglich vorhandene GC-Methode zur Aldehydbestimmung (Tabelle 3, Seite 21) zum Einsatz. Die Detektion wurde im SIM-Modus für spezifische Fragmente (Anhang Tabelle 14) durchgeführt. Die Auswertung der Signalfächen erfolgte

im Extracted-Ion-Chromatogramm (EIC). Es wurde für jeden Parametersatz eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Anhang Tabelle 14: SIM-Parameter für die Untersuchung von Aldehyden in Modellproben in Gassammelrohren zur Optimierung der SPME-Bedingungen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1

Aldehyd	Target-m/z (Qualifier-m/z) / u	Aldehyd	Target-m/z (Qualifier-m/z) / u
n-Pentanal	44 (58)	n-Oktanal	43 (57)
n-Hexanal	44 (56)	n-Nonanal	57 (89)
n-Heptanal	44 (70)	n-Dekanal	43 (57)

Für die Optimierung der Extraktionstemperatur erfolgte die Extraktion bei 30, 45 oder 60 °C für 15 min. Für die Auswahl einer Extraktionszeit wurde die Extraktion bei 60 °C für 5, 15, 30 und 60 min sowie zusätzlich bei Raumtemperatur (23 °C) für 60 min durchgeführt.

Anhang Tabelle 15: Standardgemisch mit sechs Aldehyden in Methanol zur Optimierung der SPME-Extraktionszeit und -temperatur für die Atemluftuntersuchung; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1

Aldehyd	Konzentration Standard ng- μL^{-1}	resultierende Konzentration im Gassammelrohr ng- L^{-1} Luft
n-Pentanal	30,3	152
n-Hexanal	30,3	152
n-Heptanal	31,7	159
n-Oktanal	31,3	157
n-Nonanal	30,1	151
n-Dekanal	30,7	154

Kalibrierung für die VOC-Atemluftanalytik in Gassammelrohren (Ergänzung zu Kapitel 3.2.1)

Für die Kalibrierung erfolgte die gravimetrische Herstellung einer methanolischen Stammlösung mit 24 Zielsubstanzen und drei Matrix-VOC in drei Stufen. Aus dieser wurden durch Verdünnung in Methanol zunächst sieben Standardlösungen mit einem Konzentrationsbereich 1:20 (der höchste Kalibrierpunkt hatte die 20fache Konzentration des geringsten), später neun Standardlösungen mit erweitertem Arbeitsbereich 1:70 erzeugt. Ein Beispiel für die Konzentrationen in einer solchen Kalibriereihe mit neun Lösungen ist Anhang Tabelle 16 (Seite A-11) zu entnehmen. Tabelle 8 (Seite 31) enthält die sich daraus ergebenden VOC-Gehalte nach Dotierung von 10 μL Standardlösung in ein Gassammelrohr. Die Standardlösungen wurden in Certan[®]-Flaschen bei -20 °C maximal 3 Monate aufbewahrt.

Für die Kalibrierung wurde nach dem Spülen der Gassammelrohre mit angefeuchteter, synthetischer Luft 10 μL Standardlösung (Anhang Tabelle 16) eingebracht und für 30 min euilibriert. Nach manueller SPME mit einer konditionierten Car/PDMS-Faser (75 μm) für 60 min bei Raumtemperatur folgte die Desorption für 5 min bei 280 °C, davon die anfänglichen 2 min splitless. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2) unter paralleler Aufzeichnung von Scan- und SIM-Daten. Die SIM-Parameter sind in (Anhang Tabelle 17, Seite A-12) aufgeführt. Die Auswertung der Signalflächen erfolgte für die SIM-Chromatogramme im EIC.

Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der VOC-Atemluftanalytik in Gassammelrohren (Ergänzung zu Kapitel 3.2.1)

Für die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde in drei Stufen eine methanolische Stammlösung mit 24 Zielsubstanzen und drei Matrix-VOC gravimetrisch hergestellt. Durch Verdünnung in Methanol erhielt man sechs Standardlösungen mit einem Konzentrationsbereich von ca. 1:10 mit äquidistantem Konzentrationsabstand (Anhang Tabelle 18, Seite A-12). Tabelle 9 (Seite 32) enthält die sich daraus ergebenden VOC-Gehalte nach Dotierung der Standardlösung in das Gassammelrohr.

Anhang Tabelle 16: Konzentration in ng- μL^{-1} für 24 Ziel-VOC und drei Matrixsubstanzen in methanolischen Standardgemischen für die Kalibrierung der quantitativen Untersuchung von Atemluftproben in Gassammelrohren; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1

Substanz	Konzentrationsniveau								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n-Pentan	0,061	0,122	0,267	0,527	0,795	1,08	1,41	2,92	4,28
n-Hexan	0,028	0,055	0,120	0,237	0,358	0,486	0,635	1,31	1,93
n-Heptan	0,009	0,018	0,040	0,078	0,118	0,160	0,209	0,433	0,636
n-Oktan	0,018	0,035	0,078	0,153	0,231	0,314	0,410	0,849	1,25
n-Nonan	0,022	0,045	0,098	0,193	0,291	0,395	0,516	1,07	1,57
n-Dodekan	0,026	0,052	0,113	0,223	0,336	0,457	0,596	1,23	1,81
2-Methylpentan	0,034	0,067	0,146	0,288	0,435	0,591	0,771	1,60	2,34
3-Methylpentan	0,016	0,033	0,072	0,142	0,214	0,290	0,379	0,784	1,15
Cyclohexan	0,010	0,021	0,045	0,090	0,135	0,184	0,240	0,496	0,728
Methylcyclopentan	0,010	0,020	0,044	0,087	0,131	0,178	0,232	0,481	0,705
Benzen	0,033	0,067	0,146	0,288	0,434	0,589	0,769	1,59	2,34
Ethylbenzen	0,012	0,024	0,052	0,102	0,153	0,208	0,272	0,562	0,825
n-Propylbenzen	0,004	0,007	0,016	0,032	0,048	0,065	0,085	0,176	0,258
Propanal	0,234	0,467	1,02	2,02	3,04	4,13	5,40	11,2	16,4
n-Butanal	0,025	0,050	0,110	0,217	0,328	0,445	0,581	1,20	1,76
n-Pentanal	0,026	0,052	0,113	0,223	0,336	0,457	0,596	1,23	1,81
n-Hexanal	0,027	0,053	0,116	0,228	0,345	0,468	0,611	1,26	1,85
n-Heptanal	0,027	0,054	0,119	0,234	0,353	0,479	0,626	1,30	1,90
n-Oktanal	0,035	0,070	0,153	0,302	0,455	0,619	0,807	1,67	2,45
n-Nonanal	0,028	0,055	0,120	0,237	0,357	0,485	0,633	1,31	1,92
n-Dekanal	0,028	0,056	0,122	0,241	0,364	0,495	0,646	1,34	1,96
1-Butanol	0,032	0,064	0,140	0,277	0,417	0,567	0,740	1,53	2,25
2-Butanon	0,161	0,321	0,703	1,39	2,09	2,84	3,71	7,68	11,3
2-Pentanon	0,107	0,213	0,466	0,920	1,39	1,88	2,46	5,09	7,47
2-Propanol	24	48	106	209	315	428	559	1157	1696
Aceton	47	93	205	404	609	828	1080	2236	3278
Isopren	3,06	6,09	13,4	26,3	39,7	54,0	70,4	146	214

Für die Analyse wurde in Gassammelrohre mit angefeuchteter, synthetischer Luft 10 μL Standardlösung eingebracht und für 30 min bei Raumtemperatur equilibriert. Nach manueller SPME mit einer neuen, konditionierten Car/PDMS-Faser (75 μm) für 60 min bei Raumtemperatur erfolgte die Desorption für 5 min bei 280 °C, die anfänglichen 2 min splitless. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2) unter paralleler Aufzeichnung von Scan- und SIM-Daten. Die SIM-Parameter sind in Anhang Tabelle 17 (Seite A-12) aufgeführt. Diese Untersuchung wurde als Dreifachbestimmung an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter Anwendung der gleichen SPME-Faser durchgeführt. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden einmalig ermittelt.

Die Bestimmung der Signalfächen erfolgte für die SIM-Chromatogramme im EIC. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die 24 Zielsubstanzen wurden mit der in Statist implimentierten Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 ermittelt.

Anhang Tabelle 17: SIM-Parameter für die Untersuchung des VOC-Profiles von Gasmodellproben und Atemluftproben; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1

Gruppe	Startzeit / min	gain-factor	Substanz	Retentionszeit / min	Target-m/z / u	Qualifier-m/z / u
1	5,00	10	n-Pentan	6,49	43	57, 72
			Isopren	7,07	67	53, 39
			Propanal	7,49	58	39
			Aceton	7,62	43	58
			2-Propanol	7,91	45	59
2	9,17	10	2-Methylpentan	8,87	71	57
			3-Methylpentan	9,53	57	41
			n-Hexan	10,23	57	86
			n-Butanal	11,72	72	44, 57
			Methylcyclopentan	11,89	56	69
3	14,00	10	2-Butanon	12,11	43	72, 57
			Cyclohexan	13,70	84	69
			Benzen	14,54	78	51
			n-Heptan	15,35	71	100
			1-Butanol	16,03	56	41
4	16,60	10	2-Pentanon	16,89	43	71, 86
			n-Pentanal	17,28	44	58
5	18,00	10	n-Oktan	20,69	85	57
6	21,40	10	n-Hexanal	22,75	56	67, 82
7	24,00	10	Ethylbenzen	25,22	91	106
			n-Nonan	25,80	57	85
8	27,00	10	n-Heptanal	27,86	86	70, 96
			n-Propylbenzen	29,77	91	120
9	31,00	10	n-Oktanal	32,84	100	84, 100
10	35,00	10	n-Nonanal	37,66	57	70, 98
11	38,00	10	n-Dodekan	38,93	57	71
			n-Dekanal	39,98	57	70, 82

Anhang Tabelle 18: Konzentration in ng- μL^{-1} für 24 Ziel-VOC und dre Matrixsubstanzen in methanolischen Standardlösungen zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1

Substanz	Konzentrationsniveau					
	1	2	3	4	5	6
n-Pentan	0,068	0,213	0,368	0,524	0,671	0,811
n-Hexan	0,028	0,089	0,153	0,218	0,279	0,337
n-Heptan	0,011	0,033	0,057	0,081	0,104	0,126
n-Oktan	0,019	0,060	0,104	0,148	0,190	0,230
n-Nonan	0,029	0,090	0,155	0,220	0,282	0,341
n-Dodekan	0,025	0,078	0,135	0,192	0,246	0,297
2-Methylpentan	0,035	0,108	0,186	0,264	0,339	0,409
3-Methylpentan	0,018	0,055	0,094	0,134	0,172	0,207
Cyclohexan	0,012	0,037	0,063	0,090	0,116	0,140
Methylcyclopentan	0,011	0,036	0,061	0,088	0,112	0,136
Benzen	0,034	0,106	0,182	0,259	0,332	0,401
Ethylbenzen	0,013	0,042	0,072	0,102	0,130	0,158
n-Propylbenzen	0,004	0,013	0,023	0,032	0,042	0,050
Propanal	0,255	0,796	1,37	1,95	2,50	3,02
n-Butanal	0,029	0,091	0,156	0,222	0,285	0,344
n-Pentanal	0,030	0,094	0,161	0,230	0,294	0,356
n-Hexanal	0,029	0,091	0,158	0,224	0,287	0,347
n-Heptanal	0,030	0,093	0,160	0,228	0,292	0,353
n-Oktanal	0,031	0,098	0,168	0,240	0,307	0,371
n-Nonanal	0,031	0,096	0,165	0,236	0,302	0,365
n-Dekanal	0,034	0,105	0,181	0,257	0,330	0,398
1-Butanol	0,035	0,109	0,188	0,268	0,343	0,415
2-Butanon	0,175	0,547	0,942	1,34	1,72	2,08
2-Pentanon	0,118	0,369	0,636	0,905	1,16	1,40
2-Propanol	21,1	66,0	114	162	207	251
Aceton	42,4	132	228	325	416	502
Isopren	2,60	8,10	14,0	19,9	25,5	30,8

Lagerung von Gassammelrohren mit angefeuchteter Modellluft und VOC-haltigem Standardgemisch (Ergänzung zu Kapitel 3.2.1)

Der Einfluss der Lagerzeit auf die Wiederfindung wurde für das Atemluftmodell der angefeuchteten, synthetischen Luft untersucht. Dafür erfolgte am ersten Tag (0 d) das Einbringen von 10 µL eines VOC-haltigen Standardgemisches (Standardlösung mit Konzentrationsniveau Nr. 7 in Anhang Tabelle 16, Seite A-11) in 15 vorbereitete Gassammelrohre (siehe Kapitel 3.2.1). Jeden Tag (0 d-4 d) wurden drei Proben mittels HS-SPME-GC-MS analysiert, nachdem 30 min vor Beginn der Extraktion 10 µL einer methanolischen Lösungen mit internen Standards (Anhang Tabelle 19) dotiert worden war.

Anhang Tabelle 19: Standardgemisch mit fünf deuterierten VOC in Methanol zur Untersuchung des Einflusses der Lagerung auf das VOC-Profil von Gassammelrohren mit standarddotierter, angefeuchteter Modellluft; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1

Substanz	Konzentration Standard / ng·µL ⁻¹	Konzentration in Gassammelrohr/ ng·L ⁻¹ ·Luft
3-Pentanon-D ₁₀	1,8	17,9
Toluen-D ₈	0,19	1,9
Oktan-D ₁₈	0,34	3,4
Hexanal-D ₁₂	0,53	5,3
Hexanol-D ₁₃	0,62	6,2

Die manuelle SPME wurde mit einer konditionierten Car/PDMS-Faser (75 µm) für 60 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Desorption erfolgte für 5 min bei 280 °C, die anfänglichen 2 min splitless. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2) unter paralleler Aufzeichnung von Scan- und SIM-Daten. Die SIM-Parameter sind in Anhang Tabelle 20 (Seite A-14) aufgeführt. Die Auswertung der Signalflächen erfolgte für die SIM-Chromatogramme im EIC.

Für die Auswertung wurden für die Chromatogramme jedes Gassammelrohres die Signalflächen aller Zielsubstanzen auf die Fläche des isotopenmarkierten Standards der gleichen chemischen Substanzklasse bezogen. Das Verhältnis für die drei Proben am Tag 0 d entsprach einer Wiederfindung von 100 % und war der Bezugswerte der Messergebnisse der folgenden Tage.

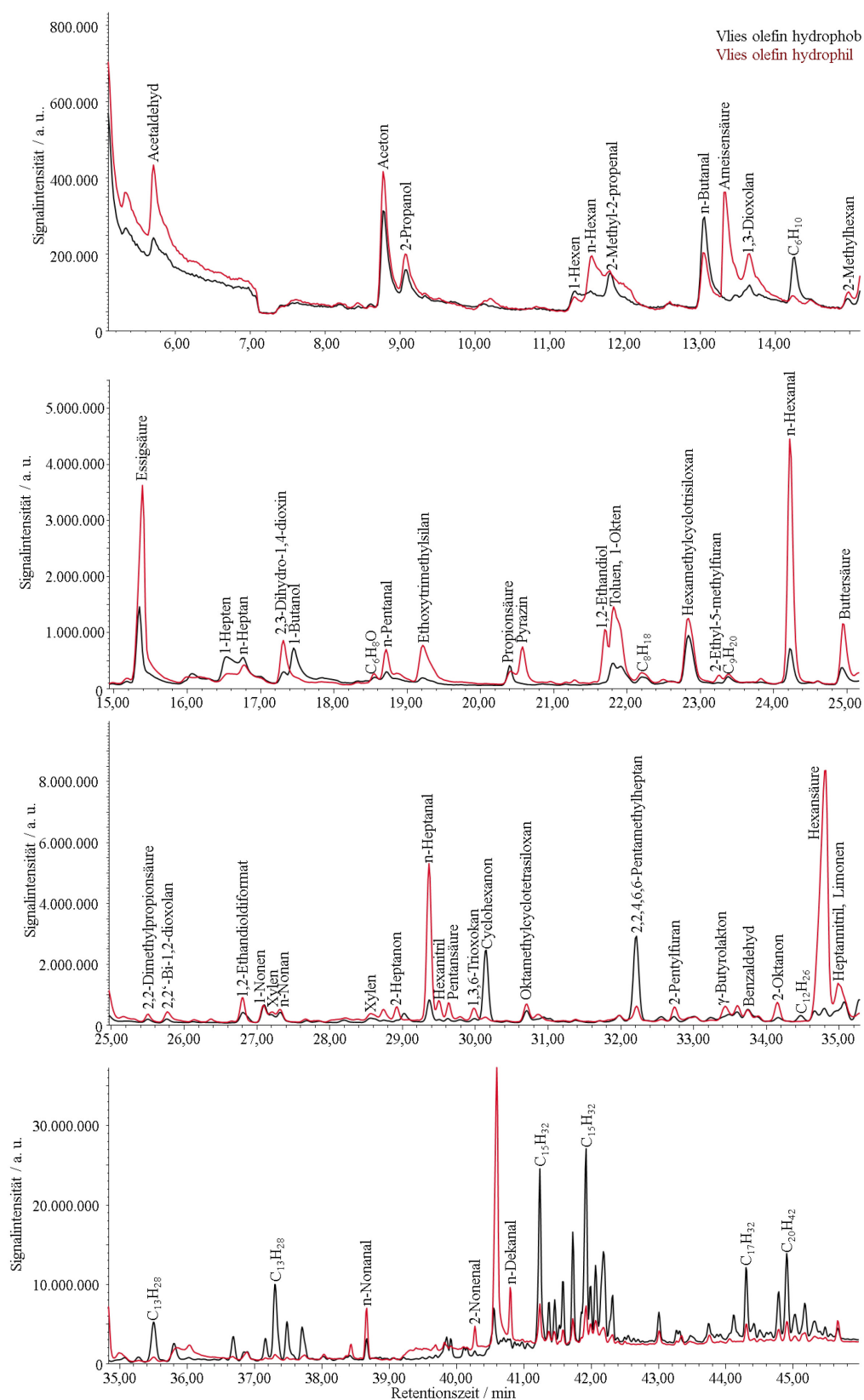
Probenahmeröhrchen: Untersuchung der Grundbelastung der Vliese (Ergänzung zu Kapitel 3.2.2)

Zur Untersuchung der Grundbelastung der Vliese wurde von den Vliesen mit asota[®] olefin Ausrüstung ein hydrophobes und ein hydrophiles Vlies in je ein 20 mL Headspace-Vial eingebracht und mit Schraubkappen mit Silikon/PTFE-Septum der Dicke 1,5 mm verschlossen.

Die SPME erfolgte automatisiert mit einer Car/PDMS-Faser (75 µm) bei 70 °C für 30 min. Die Desorption wurde bei 280 °C für 1 min durchgeführt. Der pre- und post-Bakeout der Faser wurde bei 300 °C für je 2 min durchgeführt. Die angegebenen Extraktionsbedingungen gingen aus Optimierungsversuchen hervor; diesbezügliche Informationen finden sich in der Diplomarbeit von Frau Irene Thamm [248]. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der ersten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Der Versuch wurde je Vliestyp als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Auswertung der TIC-Chromatogramme erfolgte durch Abgleich der detektierten Massenspektren mit der Datenbank. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Anhang Abbildung 2 (Seite A-15) dargestellt.

Anhang Tabelle 20: SIM-Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Lagerung auf das VOC-Profil von Gassammelrohren mit standarddotierter, angefeuchteter Modellluft; Ergänzung zu Kapitel 3.2.1

Gruppe	Startzeit min	gain-factor	Substanz	Retentionszeit min	Target-m/z / u	Qualifier-m/z / u
1	5,00	10	n-Pentan	6,49	43	57, 72
			Isopren	7,07	67	53, 39
			Propanal	7,49	58	39
			Aceton	7,62	43	58
			2-Propanol	7,91	45	59
2	9,17	10	2-Methylpentan	8,87	71	57
			3-Methylpentan	9,53	57	41
			n-Hexan	10,23	57	86
			n-Butanal	11,72	72	44, 57
			Methylcyclopentan	11,89	56	69
			2-Butanon	12,11	43	72, 57
			Cyclohexan	13,70	84	69
3	14,00	10	Benzen	14,54	78	51
			n-Heptan	15,35	71	100
			1-Butanol	16,03	56	41
4	16,60	10	2-Pentanon	16,89	43	71, 86
			3-Pentanon-D ₁₀	16,93	62	96
			n-Pentanal	17,28	44	58
5	18,00	10	n-Oktan-D ₁₈	20,06	50	82, 132
			Toluol-D ₈	20,06	100	70
			n-Oktan	20,69	85	57
6	21,40	10	n-Hexanal-D ₁₂	22,40	48	64
			n-Hexanal	22,75	56	67, 82
7	24,00	10	Ethylbenzen	25,22	91	106
			n-Nonan	25,80	57	85
			n-Hexanol-D ₁₃	26,07	64	50, 46
8	27,00	10	n-Heptanal	27,86	86	70, 96
			n-Propylbenzen	29,77	91	120
9	31,00	10	n-Oktanal	32,84	100	84, 100
10	35,00	10	n-Nonanal	37,66	57	70, 98
11	38,00	10	n-Dodekan	38,93	57	71
			n-Dekanal	39,98	57	70, 82

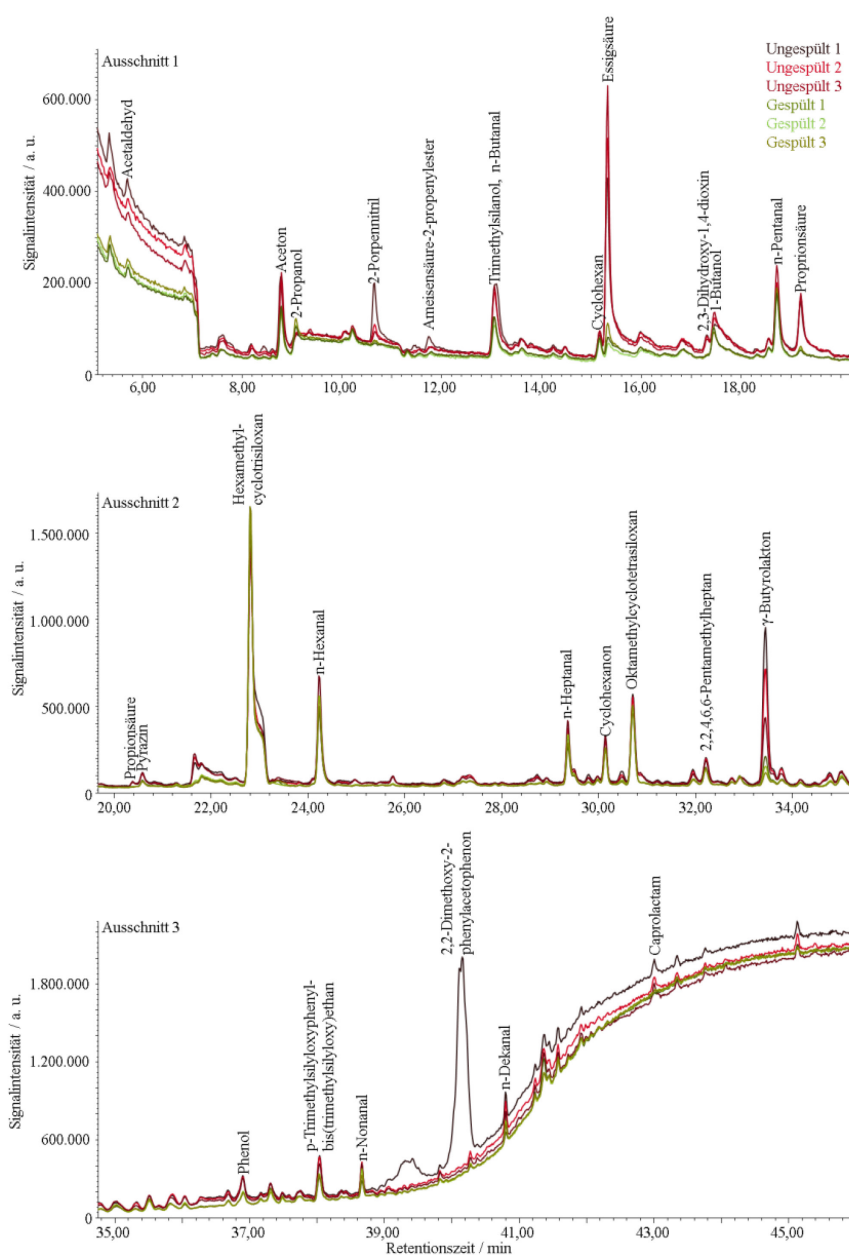


Anhang Abbildung 2: HS-SPME-GC-MS Chromatogramm von asota® olefin-modifizierten Vliesen (Hintergrundbelastung); Ergänzung zu Kapitel 3.2.2

Versuch zur Reinigung der Probenahmeröhrchen durch Spülen mit synthetischer Luft (Ergänzung zu Kapitel 3.2.2)

Drei Probenahmeröhrchen mit Vliesen wurden für je 10 min mit synthetischer Luft gespült. Die Erfassung des durch die Probenahmeröhrchen durchgeströmten Volumens an Spülgas erfolgte mit einem Spirometer (113-116 L). Die Probenahmeröhrchen wurden mit Schraubkappen mit Apertur und eingelegtem Silikon/PTFE-Septum verschlossen.

Es folgte die Untersuchung sowohl der gespülten Probenahmeröhrchen als auch von drei ungespülten Probenahmeröhrchen mit HS-SPME-GC-MS. Es wurde mit einer Car/PDMS-Faser (75 μ m) für 1 h bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) extrahiert; die Extraktionsbedingungen wurden hier analog zur Untersuchung der Realproben (1 h bei Raumtemperatur gewählt). Die Desorption der SPME-Faser im Injektor bei 280 °C erfolgte für 5 min, davon die ersten 3 min bei geschlossenem Splitventil. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der ersten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2).



Anhang Abbildung 3: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von gespülten und ungespülten Probenahmeröhrchen mit Vliesen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2

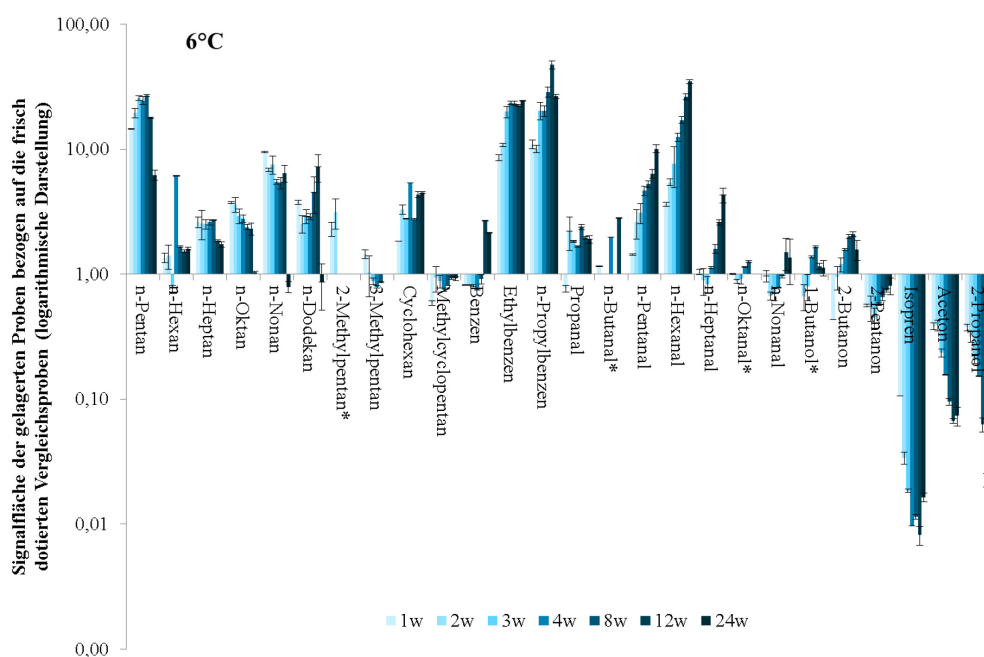
Lagerversuch von Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen (Ergänzung zu Kapitel 3.2.2)

Für diesen Versuch wurden 42 Probenahmeröhrchen mit Vliesen und Schraubkappen mit Apertur und Silikon-Septen eingesetzt. In 28 dieser Röhrchen erfolgte zu Versuchsbeginn die Einbringung von 10 µL eines VOC-haltigen Standardgemisches (Standardlösung mit Konzentrationsniveau Nr. 7 in Anhang Tabelle 16 Nr. 7, Seite A-11). Es schloss sich eine Lagerung der Röhrchen im Dunkeln bei Raumtemperatur bei ca. 23 °C oder im Kühlschrank bei 6 °C für 1, 2, 3, 4, 8, 12 und 24 Wochen an. Je Lagertemperatur und -zeit erfolgte die HS-SPME-GC-MS-Analyse von zwei Röhrchen. Zum Vergleich wurden zu jedem der sieben Messzeitpunkte zwei Probenahmeröhrchen einen Tag vor der Untersuchung mit 10 µL Standardlösung dotiert, über Nacht bei Raumtemperatur equilibriert und parallel zu den gelagerten Proben analysiert.

Außerdem erfolgte die Untersuchung des Einflusses der Equilibrierungszeit von einem Tag für vliesgefüllte und leere Probenahmeröhrchen im Vergleich zur Analyse von Probenahmeröhrchen sofort nach dem Dotieren des Standards. Dafür wurden in zwei Probenahmeröhrchen (einmal ohne Vliese, einmal mit Vliese) 10 µL des VOC-haltigen Standardgemisches eingebracht. Die Röhrchen wurden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die analoge Vorbereitung zweier weiterer Röhrchen und anschließend die HS-SPME-GC-MS-Analyse von allen vier Proben.

Die SPME wurde manuell mit einer Car/PDMS-Faser (75 µm) bei Raumtemperatur (23 °C) für 1 h durchgeführt. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2) unter paralleler Aufzeichnung von Scan- und SIM-Daten. Die SIM-Parameter entsprechen denen, die bei der Analyse der Realproben angewendet wurden (Anhang Tabelle 17, Seite A-12).

Die Auswertung der Signalfächen erfolgte für die SIM-Chromatogramme im EIC. Für die in Doppelbestimmung untersuchten Lagerversuchsproben wurde der Mittelwert gebildet und die gelagerten Proben zu den frisch-dotierten Proben ins Verhältnis gesetzt. Es erfolgte keine Auswertung für n-Dekanal, da das Signal in den meisten Proben aufgrund von Koelution nicht ausgewertet werden konnte.



Anhang Abbildung 4: Veränderung des VOC-Profiles in standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen bei 6 °C über 24 Wochen; dargestellt ist das Verhältnis der Signalfächen (HS-SPME-GC-MS-Untersuchungen) der VOC in gelagerten Proben zu frisch dotierten Vergleichsproben (Mittelwert und Standardabweichung, n=2) in logarithmischer Auftragung. *: nicht alle Datensätze auswertbar aufgrund von Koelution; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2

Lagerversuch von Probenahmeröhrchen mit Silikon/PTFE-Septen (Ergänzung zu Kapitel 3.2.2)

Der oben beschriebene Lagerversuch mit Probenahmeröhrchen wurde unter Anwendung von Silikon/PTFE-Septen anstelle von Silikon-Septen wiederholt. Abweichend davon erfolgte die Analyse der gelagerten Probenahmeröhrchen nach 1, 2, 4 und 12 Wochen.

Untersuchung der Adsorptionsfähigkeit der Probenahmeröhrchen für die Zielsubstanzen (Ergänzung zu Kapitel 3.2.2)

Gassammelrohre mit einem Volumen von 1 L wurden mit angefeuchteter, synthetischer Luft gespült (vgl. Kapitel 3.2.1) und anschließend mit 10 µL eines VOC-haltigen Standardgemisches (Anhang Tabelle 21) dotiert. Es erfolgte keine Einbringung von Matrix-VOC; diese waren in einer ersten Versuchsdurchführung berücksichtigt worden und hatten aufgrund der hohen Konzentration eine Überladung des Tenax TA-Adsorberröhrchens und der GC-Säule verursacht.

Es erfolgte die Adaption eines mit Vliesen gefüllten Probenahmeröhrchens mit Silikon/PTFE-Septen an das Gassammelrohr. An die andere Seite des Probenahmeröhrchens wurde ein mit Tenax TA gefülltes Adsorberröhrchen befestigt. Die Überführung der Modellluft aus dem Gassammelrohr auf das Probenahmeröhrchen und den nachfolgenden Tenax TA-Adsorber erfolgte mit einem „Argon-Stempel“. Dafür wurde Argon mit einem Fluss von 50 mL·min⁻¹ für 30 min von unten durch das Gassammelrohr gespült. Die Kontrolle des Gasflusses erfolgte mit einem Schwebekörper-Durchflussmesser. Das Probenahmeröhrchen wurde mit manueller HS-SPME-GC-MS untersucht und das Adsorberröhrchen mit TD-GC-MS. Zum Vergleich erfolgte die Durchführung eines analogen Versuches ohne Probenahmeröhrchen. Ferner wurde als Vergleich angefeuchtete, synthetische Luft aus dem Gassammelrohr auf das Probenahmeröhrchen überspült und erst anschließend 10 µL des Standards direkt in das Probenahmeröhrchen dotiert. Jede Durchführung erfolgte als Dreifachbestimmung.

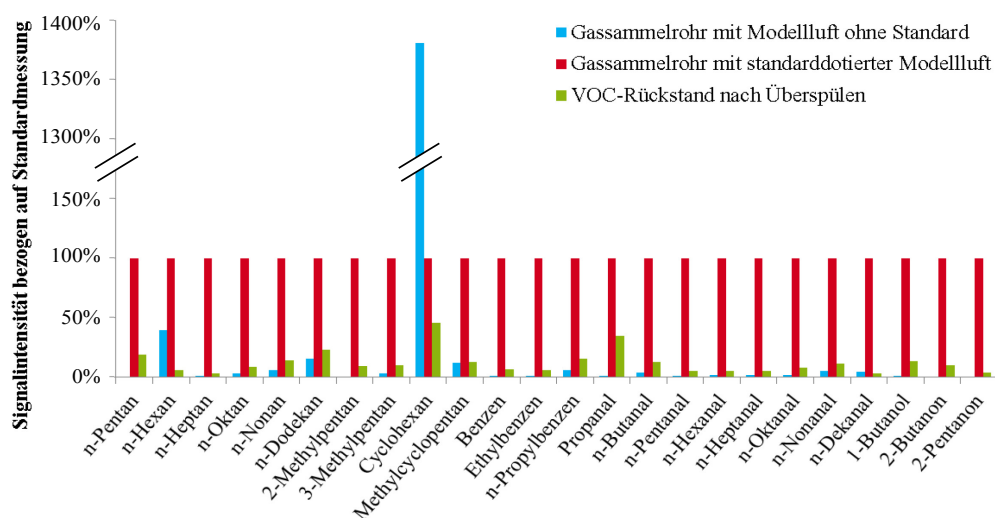
Anhang Tabelle 21: Standardgemisch mit 24 Ziel-VOC in Methanol zur Untersuchung der Adsorptionsfähigkeit der Probenahmeröhrchen; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2

Substanz	Gehalt	Substanz	Gehalt	Substanz	Gehalt
Gehalt im Standardgemisch / ng·µL ⁻¹					
n-Pentan	1,72	Cyclohexan	0,287	n-Hexanal	0,825
n-Hexan	0,690	Methylcyclopentan	0,272	n-Heptanal	0,836
n-Heptan	0,253	Benzen	1,00	n-Oktanal	0,858
n-Oktan	0,542	n-Propylbenzen	0,100	n-Nonanal	0,843
n-Nonan	0,579	Ethylbenzen	0,321	n-Dekanal	0,861
n-Dodekan	0,635	Propanal	6,59	1-Butanol	0,878
2-Methylpentan	0,787	n-Butanal	0,770	2-Pentanon	3,10
3-Methylpentan	0,465	n-Pentanal	0,765	2-Butanon	4,63
Gehalt in der Modellluft / ng·L ⁻¹					
n-Pentan	17,2	Cyclohexan	2,87	n-Hexanal	8,25
n-Hexan	6,90	Methylcyclopentan	2,72	n-Heptanal	8,36
n-Heptan	2,53	Benzen	10,0	n-Oktanal	8,58
n-Oktan	5,42	n-Propylbenzen	1,00	n-Nonanal	8,43
n-Nonan	5,79	Ethylbenzen	3,21	n-Dekanal	8,61
n-Dodekan	6,35	Propanal	65,9	1-Butanol	8,78
2-Methylpentan	7,87	n-Butanal	7,70	2-Pentanon	31,0
3-Methylpentan	4,65	n-Pentanal	7,65	2-Butanon	46,3

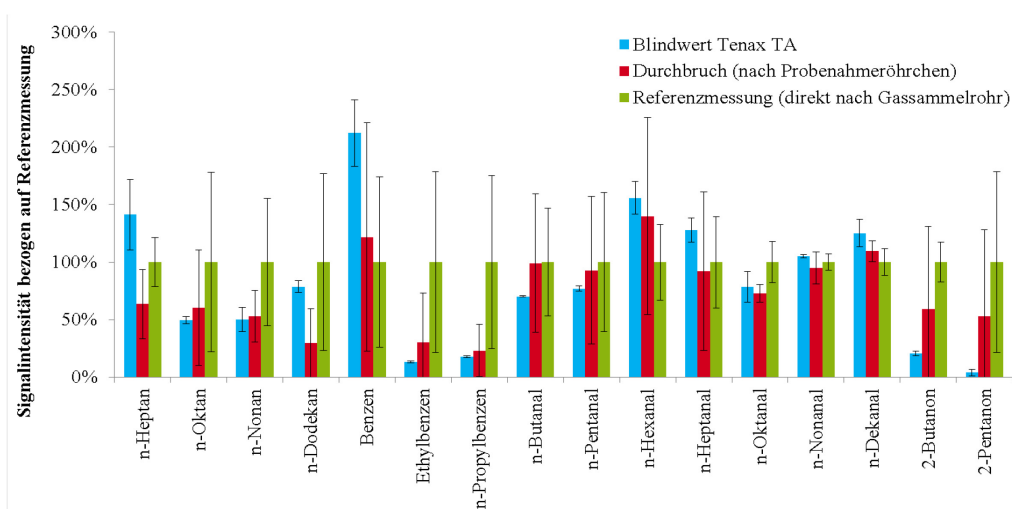
Die SPME erfolgte manuell mit einer Car/PDMS-Faser (75 µm) bei Raumtemperatur (23 °C) für 1 h. Die Faser wurde für 5 min bei 280 °C desorbiert, davon die ersten 3 min bei geschlossenem Splitventil. Die TD-GC-MS-Untersuchungen der Tenax TA-Röhrchen erfolgte mit den Parametern für die Desorption und Kryofokussierung die im Rahmen der Methodenoptimierung für die DHS mit Tenax TA angewendet worden waren (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel

A.2) unter paralleler Aufzeichnung von Scan- und SIM-Daten (Anhang Tabelle 17, Seite A-12). Die Auswertung der Signalflächen erfolgte für die SIM-Chromatogramme im EIC.

Zur Kontrolle wurde der Inhalt eines mit angefeuchteter, synthetischer Luft gespülten Gassammelrohres, eines mit Standardlösung dotierten Gassammelrohres und eines Gassammelrohres nach dem Überspülen mit Argon mit HS-SPME-GC-MS analysiert. Diese Bestimmungen erfolgten als Einfachbestimmungen. Dabei konnten für die meisten VOC im Chromatogramm des zum Überspülen eingesetzten Gassammelrohres Signalflächen unter 10 % des dotierten Niveaus festgestellt werden. Höhere Rückstände waren für 1-Butanol (12 %), n-Pentan (19 %) und Propanal (34 %) zu beobachten. Die Substanzen n-Hexan und Cyclohexan konnten aufgrund zu hoher Blindwerte nicht beurteilt werden (Anhang Abbildung 5, Seite A-19). Der hohe Grundgehalt an Cyclohexan konnte in anderen Untersuchungen zur VOC-Grundbelastung von Gassammelrohren nicht bestätigt werden. Die Cyclohexanwerte wurden in den Probenahmeröhrchen und den Tenax TA-Röhrchen aufgrund dieses hohen Blindwertes nicht ausgewertet.



Anhang Abbildung 5: Wiederfindung von Ziel-VOC in Gassammelrohren beim Versuch zum Überspülen von Modellluft auf Probenahmeröhrchen untersucht mit HS-SPME-GC-MS (n=1); blau: Blindwert von Modellluft ohne Standard in Gassammelrohr, rot: standarddotierte Modellluft in Gassammelrohr (Referenz), grün: VOC-Rückstand in Gassammelrohr nach dem Überspülen der standarddotierten Modellluft; Ergänzung zu Kapitel 3.2.2



Anhang Abbildung 6: Wiederfindung von 16 Ziel-VOC im nachgeschalteten Tenax TA-Röhrchen beim Versuch zum Überspülen von Modellluft auf Probenahmeröhrchen untersucht mit TD-GC-MS (Mittelwert und Standardabweichung, n=3); blau: Blindwert von Tenax TA, rot: Tenax TA nach Probenahmeröhrchen, auf das standarddotierte Modellluft gespült wurde (Durchbruch), grün: Überspülen der standarddotierter Modellluft direkt auf Tenax TA (Referenz); Ergänzung zu Kapitel 3.2.2

In Anhang Abbildung 6 sind die Ergebnisse der TD-GC-MS-Analyse der Tenax-TA-Röhrchen dargestellt. Nur 16 Zielsubstanzen konnten ausgewertet werden; die restlichen Substanzen konnten entweder nicht detektiert werden oder die Signale waren durch Koelution oder unzureichende Peakform nicht auswertbar. Aufgrund unzureichender Wiederholbarkeiten konnte aus dieser ergänzenden Untersuchung keine Schlussfolgerung abgeleitet werden.

A.4 Ergänzungen zur VOC-Analytik in Zellkulturen

Zellanzucht (Ergänzung zu Kapitel 3.3)

Die Anzucht der Lungenadenokarzinomzelllinien wurde von der EPO GmbH durchgeführt. Die Zellanzucht erfolgte nach standardisierten Protokollen mit den in Tabelle 11 (Seite 40) angegebenen Nährmedien in T150-Einwegzellkulturflaschen mit Filterdeckeln und mit ca. 25 mL Medium. Die Kultivierung wurde in einem Brutschrank bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchte zwischen 90 % und 98 % mit CO₂-angereicherter Luft (5 % CO₂, 95 % Luft) durchgeführt. Die letzte Passage erfolgte am Tag vor der Extraktion mit 25,0 mL Nährmedium.

Voruntersuchungen zum Einsatz der SPME-Technik in Zellkulturen (Ergänzung zu Kapitel 3.3.1)

Der Vorversuch erfolgte mit A549-Zellen. Für den Vorversuch wurde die letzte Passage mit $5.6 \cdot 10^7$ Zellen durchgeführt. Fünfundvierzig Minuten vor Beginn der Extraktion erfolgte das Unterbinden des Luftaustauschs mit der Umgebung, indem eine Kunststoffolie aus Polyethylen in den Deckel eingedreht wurde. Die Extraktion erfolgte manuell mit einer konditionierten Car/PDMS-Fasern (75 µm). Dabei wurde der Sterilfilter und die PE-Folie der vorbereiteten Zellkultur durchstoßen, die SPME-Faser im Anschluss komplett ausgefahren und der SPME-Halter mittels eines Reagenzglasständers stabilisiert (Abbildung 26, Seite 42). Die Extraktion erfolgte im Brutschrank bei 37 °C für 2 h 20 min. Danach wurde die SPME-Faser aus dem Halter ausgebaut und in einem verschlossenen Reagenzglas auf Trockeneis zur BAM Adlershof transportiert.

Die Thermodesorption der beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems fand binnen 6 h nach Extraktionsende statt. Die Desorption erfolgte bei 280 °C für 1 min. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der ersten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Dabei wurden nur Scan-Daten aufgenommen.

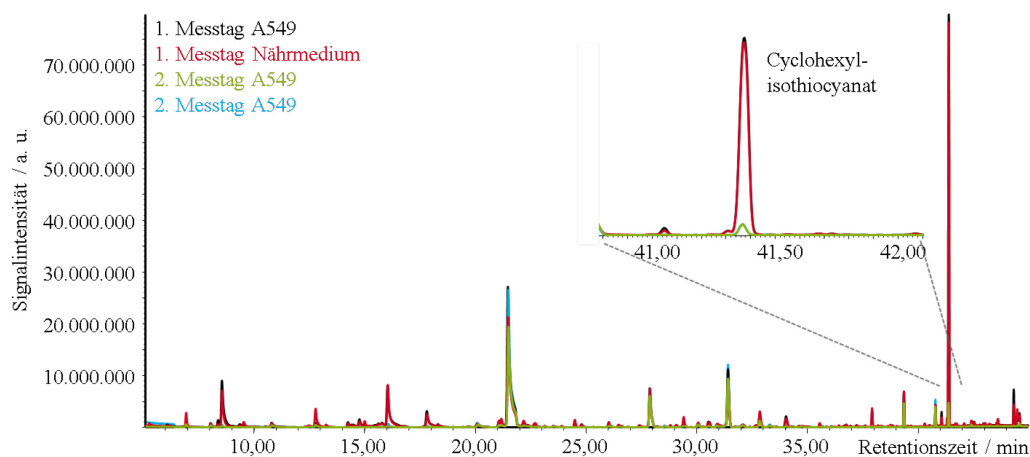
Der Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt und die erhaltenen Chromatogramme qualitativ ausgewertet. Dabei erfolgte die Betrachtung von Signalen mit einer Höhe von mindestens 100.000 a. u.. Für die Auswertung wurden die detektierten Massenspektren mit Datenbankspektren abgeglichen. Ferner erfolgte für bereits untersuchte Standardsubstanzen ein Vergleich mit der Retentionszeit. In Anhang Tabelle 22 (Seite A-21) sind alle betrachteten Signale aufgelistet.

Einfluss des Dichtungsmaterials in Transportgläschen auf das analysierte VOC-Profil in Zellkulturen (Ergänzung zu Kapitel 3.3.1)

Bei zusätzlichen Untersuchungen mit *in-situ*-SPME-GC-MS in A549-Zellkulturen (Durchführung nicht dargestellt) kamen in den Glasröhrchen eingelagerte Fasern an zwei aufeinanderfolgenden Messtagen zum Einsatz. Dabei waren die Fasern am ersten Messtag bereits über einen Monat in den Glasröhrchen aufbewahrt worden, während die vom zweiten Messtag weniger als 24 h in den Röhrchen lagerten. Am ersten Messtag konnte ein sehr intensives Signal mit einer Retentionszeit von 41,37 min beobachtet werden, welches bei vorherigen Analysen nicht und bei den Untersuchungen am zweiten Messtag nur mit deutlich erniedrigter Intensität auftrat (Anhang Abbildung 7, Seite A-21). Durch MS-Spektrenvergleich mit der Datenbank erfolgte die Identifizierung als Cyclohexylisothiocyanat.

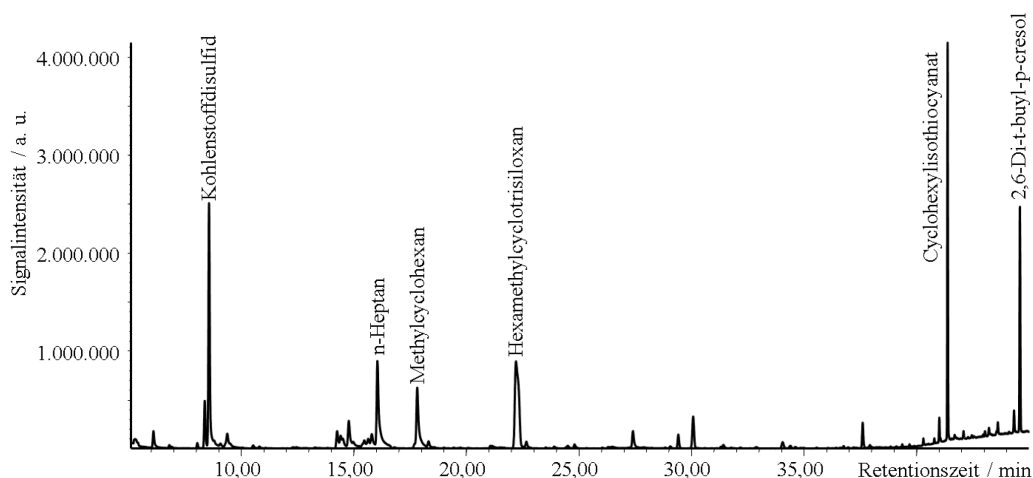
Anhang Tabelle 22: Liste der Signale im *in-situ*-SPME-GC-MS-Chromatogramm einer A549-Zellkultur mit einer minimalen Signalintensität von 100.000 a. u.; Ergänzung zu Kapitel 3.3.1

Peak	t _R / min	Identifizierung	Peak	t _R / min	Identifizierung
1	4,00	“Luft”	30	28,18	m-/p-Xylen
2	8,07	Ethanol	31	29,61	Styren
3	9,10	Propanal	32	30,26	Cyclohexanol
4	9,29	Aceton	33	31,22	Cyclohexanon
5	9,64	2-Propanol	34	31,74	Octamethylcyclotetrasiloxan
6	10,85	2-Methyl-2-propanol	35	31,84	3-Methylnonan
7	11,46	3-Methylpentan	36	32,51	n-Propylbenzen
8	12,22	n-Hexan	37	32,86	1-Ethyl-3-methylbenzen
9	12,78	1-Propanol	38	33,04	1-Ethyl-4-methylbenzen
10	14,04	Methylcyclopentan	39	33,37	n-Dekan
11	14,30	2-Butanon, Ethylacetat	40	34,15	1-Ethyl-2-methylbenzen
12	15,30	Chloroform	41	34,85	γ-Butyrolakton
13	16,01	Cyclohexan	42	35,08	1,2,4-Trimethylbenzen
14	16,40	2-Methyl-1-propanol	43	35,49	2-Oktan
15	16,84	Benzen	44	36,12	n. i.
16	17,66	n-Heptan	45	36,67	1,2,3-Trimethylbenzen
17	18,32	1-Butanol	46	37,11	2-Ethyl-1-hexanol
18	19,22	2-Pentan	47	37,28	n. i.
19	19,65	3-Pentan	48	37,39	Methylpropylbenzen
20	21,70	3-Methylheptan, 3-Ethylhexan	49	37,56	Diethylbenzen
21	22,61	Fluortrimethylsilan	50	38,52	n. i.
22	22,77	Toluen	51	38,69	2,5-Bis[(trimethylsilyl)oxy]-benzaldehyde,
23	23,11	n-Oktan, 2,4-Dimethylheptan	52	39,07	Acetophenon
24	23,76	Hexamethylcyclotrisiloxan	53	39,26	n-Nonanal
25	24,40	3-Hexanon	54	39,38	5-Methylundekan
26	24,81	2-Hexanon,	55	39,74	3-Methylundekan
27	25,16	Essigsäurebutylester	56	40,30	n-Dodekan
28	26,79	Ethoxy(methoxy)-methylsilan	57	41,69	1,3-Di-t-Butylbenzen
29	27,74	Ethylbenzen	58	43,36	n-Tetradekan

t_R: Retentionszeit, n. i.: nicht identifizierbar**Anhang Abbildung 7:** *In-situ*-SPME-GC-MS-Chromatogramme von A549-Zellkulturen an zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungstagen mit einem zusätzlich auftretenden, intensiven Signal bei 41,37 min am ersten Untersuchungstag; Ergänzung zu Kapitel 3.3.1

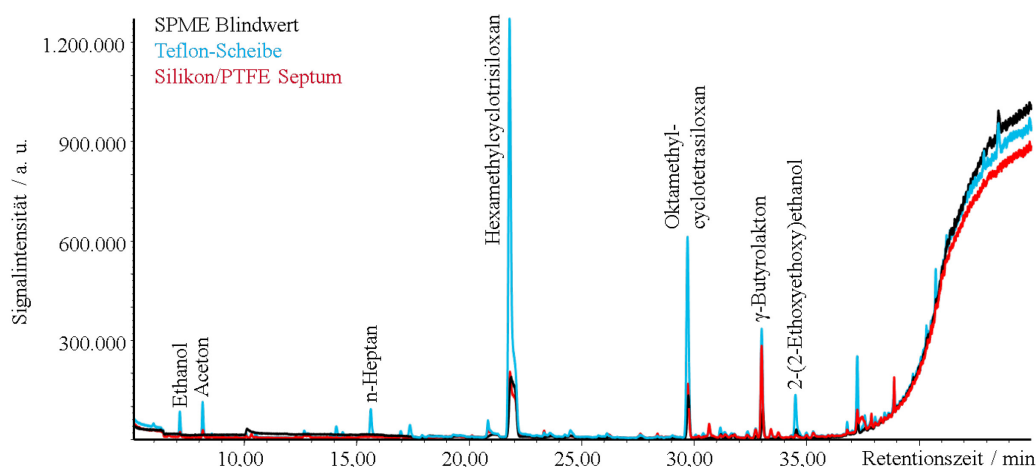
Ein Zusammenhang mit dem Zellstoffwechsel war unwahrscheinlich, da das Signal auch in Proben mit zellfreiem Nährmedium beobachtet werden konnte. Wahrscheinlich verursachte das in den Glasröhrchen enthaltenen originale Dichtungsmaterial das zusätzliche Signal. Aus diesem Grund wurde dieses separat mittels automatisierter HS-SPME-GC-MS untersucht. Dafür wurde eine Dichtung in ein 20 mL-SPME-Vial gegeben und mit Bördekappen mit Silikon/PTFE-Septum verschlossen. Die Extraktion erfolgte automatisiert mit Car/PDMS-Faser (75 µm) bei 37 °C für 15 min. Die Desorption geschah splitless für 5 min bei 280 °C, wobei das Splitventil nach 2 min geöffnet wurde. Die GC-MS-

Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Es wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Neben dem Cyclohexylisothiocyanat konnten noch weitere flüchtige Substanzen detektiert werden (Anhang Abbildung 8).



Anhang Abbildung 8: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm des ursprünglich in den Glasröhrchen enthaltenen Dichtungsmaterials; Ergänzung zu Kapitel 3.3.1

Um eine Kontamination der Fasern bei dem Transport und der Lagerung durch das Dichtungsmaterial auszuschließen, wurden zwei Alternativen – eine Teflonscheibe und ein Silikon/PTFE-Septum (Abbildung 30, Seite 43) – getestet. Dazu erfolgte die Aufnahme von GC-MS-Chromatogrammen für zwei konditionierte Car/PDMS-Fasern. Anschließend wurde je eine Faser in einem Glasröhrchen mit Teflon-Scheibe oder Silikon/PTFE-Septum für 24 h bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend folgte erneut die Thermodesorption der gelagerten Fasern im Injektor des GC-MS-Systems. Diese wurde für 5 min bei 280 °C durchgeführt, davon die anfänglichen 2 min splitless. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Es wurden nur Scan-Daten aufgenommen.



Anhang Abbildung 9: GC-MS-Chromatogramme von SPME-Fasern, die für 24 h in Glasröhrchen mit alternativen Dichtungsmaterialien lagerten, im Vergleich zu einer frisch konditionierten Faser (Blindwert); Ergänzung zu Kapitel 3.3.1

In Anhang Abbildung 9 ist zu erkennen, dass bei Verwendung des Silikon/PTFE-Septums deutlich weniger neue Signale festzustellen waren als bei Einsatz der Teflon-Scheibe. Aus diesem Grund wurde im Weiteren das Silikon/PTFE-Septum als Dichtungsmaterial in den Transportgläsern eingesetzt.

Optimierung der SPME-Bedingungen für die Zellkulturanalytik mit in-situ-SPME (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2)

Die Optimierung der Extraktionszeit für die SPME erfolgte mit A549-Zellen. Für den Vorversuch wurde die letzte Passage mit $1 \cdot 10^6$ Zellen durchgeführt. Bei der letzten Passage erfolgte ein Austausch der Filterkappen durch die speziellen Septumkappen (Abbildung 28, Seite 43). Eine Stunde vor Beginn der *in-situ*-SPME wurden die Kulturflaschen durch Drehen der Septumkappen gasdicht verschlossen.

Die Extraktion erfolgte manuell mit konditionierten Car/PDMS-Fasern (75 μm) unter Einsatz des PTFE-Werkstücks (Abbildung 29, Seite 43) zur Stabilisierung. Die Extraktion fand im Brutschrank bei 37 °C für 15, 30 oder 60 min statt. Danach wurde die SPME-Faser aus dem Halter ausgebaut und in einem verschlossenen Reagenzglas mit Silikon/PTFE-Einsatz (Abbildung 30, Seite 43) auf Trockeneis zur BAM Adlershof transportiert. Die Thermodesorption der beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems fand binnen 6 h nach Extraktionsende statt. Die Desorption erfolgte bei 280 °C für 5 min, wobei das Splitventil nach 3 min geöffnet wurde. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Dabei wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Der Versuch wurde für jede Extraktionszeit als Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die Auswertung wurden die detektierten Massenspektren mit Datenbankspektren abgeglichen. Ferner erfolgte für bereits untersuchte Standardsubstanzen ein Vergleich der Retentionszeiten. Das Ergebnis ist in Kapitel 3.3.2 dargestellt.

VOC-Hintergrundbelastung von Zellkulturflaschen (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2)

Bei unbenutzten Zellkulturflaschen, wie vom Hersteller geliefert, wurden die Filterkappen durch Septumkappen ersetzt und gasdicht verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C im Trockenschrank folgte eine *in-situ*-SPME-Extraktion mit einer Car/PDMS (75 μm)-Faser für 15 min bei 37 °C im Trockenschrank. Die Thermodesorption der beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems fand sofort nach Extraktionsende statt. Die Desorption erfolgte bei 280 °C für 5 min, wobei das Splitventil nach 3 min geöffnet wurde. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Dabei wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Für die Auswertung wurden die detektierten Massenspektren mit Datenbankspektren abgeglichen. Ferner erfolgte für bereits untersuchte Standardsubstanzen ein Vergleich der Retentionszeiten. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.1.1 beschrieben.

Test verschiedener Reinigungsprozeduren für Zellkulturflaschen (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2)

Es wurden zwei Reinigungsverfahren zur Reduktion der Grundbelastung der Zellkulturflaschen getestet: Das „Spülen“ erfolgte für neue Zellkulturflaschen durch dreimaliges Ausspülen zunächst mit Wasser und anschließend mit Methanol bevor sich das Trocknen mit Druckluft anschloss. Bei der „Adsorption“ wurden in neue Zellkulturflaschen über Nacht (ca. 16 h) je 2,5 g Aktivkohlegranulat eingewickelt in zwei Filterbeutel positioniert und bei 37 °C im Trockenschrank gelagert. Es erfolgte der Einsatz mehrerer Lagen Filter, um ein Austreten von Kohlestaub zu verhindern, da dies die Analyse nachteilig beeinflusst hätte. Anschließend wurde die Aktivkohle wieder entfernt.

Die gereinigten Flaschen wurden mit dem Septumdeckel gasdicht verschlossen und für 1 h bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Es folgte die *in-situ*-SPME-Extraktion mit einer Car/PDMS (75 μm)-Faser für 60 min bei 37 °C. Die Thermodesorption der beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems fand sofort nach Extraktionsende statt. Die Desorption erfolgte bei 280 °C für 5 min, wobei das Splitventil nach 3 min geöffnet wurde. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Dabei wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Für die Auswertung wurden die Retentionszeiten und Massenspektren der Signale mit denen von Standardsubstanzen verglichen. Die Ermittlung der Signal-

flächen erfolgte im EIC für substanzspezifische Fragmente von 53 VOC (Anhang Tabelle 23). Die Untersuchung wurde jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt. Eine Übersicht über die im Vergleich zur ungereinigten Zellkulturflasche erreichten Wiederfindungen gibt Anhang Tabelle 24 (Seite A-25).

Für den geringen Einfluss des Spülens auf n-Undekan im Vergleich zu anderen Alkanen, die auf 1-46 % der Ausgangswerte gesenkt wurden, konnte keine Ursache ermittelt werden; für die Massenspur m/z 57 u, die zur Auswertung verwendet wurde, war keine Koelution zu beobachten.

Anhang Tabelle 23: Liste der in Zellkulturen untersuchten VOC inklusive Angabe der Retentionszeit und des m/z-Verhältnisses des zur Bestimmung der Signalfläche verwendeten Fragments; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Retentionszeit / min	m/z / u	Substanz	Retentionszeit / min	m/z / u
n-Pentan	6,49	43	Pyrrol	22,26	67
n-Hexan	10,24	57	Propanal	7,47	58
n-Heptan	15,33	71	n-Butanal	11,70	44
n-Oktan	20,71	85	n-Pentanal	17,25	44
n-Nonan	25,82	57	n-Hexanal	22,75	82
n-Dekan	30,59	142	n-Heptanal	27,86	86
n-Dodekan	38,95	57	n-Oktanal	32,85	84
n-Tridekan	40,76	57	n-Nonanal	37,65	57
n-Tetradekan	42,12	57	n-Dekanal	39,98	57
2-Methylbutan	5,84	43	3-Methylbutanal	15,03	44
2-Methylpentan	8,87	71	2-Methyl-2-propenal	10,50	70
3-Methylpentan	9,53	57	2-Methyl-2-butenal	20,05	84
2-Methylhexan	13,58	85	Aceton	7,62	73
3-Methylhexan	14,08	71	2-Butanon	12,12	71
3-Methylheptan	19,33	85	2-Pentanon	16,87	43
3-Methylnonan	29,27	57	3-Pentanon	17,29	86
3-Methylundekan	38,28	57	2-Hexanon	22,34	100
Cyclohexan	13,71	84	3-Hexanon	21,94	100
Methylcyclopentan	11,88	56	2-Oktanon	32,29	43
2-Methyl-1-penten	9,99	56	Cyclohexanon	28,56	55
2,4-Dimethyl-1-hepten	23,12	43	Ethanol	6,59	45
Benzen	14,52	78	1-Propanol	10,69	59
Ethylbenzen	25,23	91	2-Propanol	7,92	45
o-Xylen	26,99	91	1-Butanol	16,04	56
p-Xylen	25,67	91	2-Methyl-2-propanol	9,00	59
Styren	27,01	104	2-Ethyl-1-hexanol	34,45	57
Cumen	28,27	105	Cyclohexanol	27,71	82
n-Propylbenzen	29,76	91	Essigsäure ^a	14,15	60
1-Ethyl-2-methylbenzen	31,11	105	Propionsäure ^a	18,96	74
1-Ethyl-3-methylbenzen	30,07	105	Ethylacetat	12,24	61
1-Ethyl-4-methylbenzen	30,22	105	n-Butylacetat	22,76	61
Mesitylen	30,44	105	n-Propylpropionat	23,23	75
1,2,3-Trimethylbenzen	33,63	105	Ethylbutyrat	22,52	60
1,2,4-Trimethylbenzen	31,88	120	γ -Butyrolakton	32,63	42
Acetophenon	37,30	105	Ethylbutyrat	21,98	60
Phenol	35,49	91	Kohlendisulfid ^b	8,12	76

a: Säuren wiesen sehr starkes Tailing und hohe Peakhalbwertsbreiten auf, b: Substanzen nicht kalibriert, sondern nur im qualitativen Vergleich ausgewertet

Anhang Tabelle 24: Wiederfindungen von VOC in gereinigten Zellkulturflaschen im Vergleich mit unbehandelten Flaschen, Angabe in % in der Form Mittelwert n=3 (Standardabweichung); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	unbehandelt	Spülen	Adsorption
n-Pentan	100 (9)	1 (1)	1 (0)
n-Hexan	100 (3)	3 (3)	1 (0)
n-Heptan	100 (3)	4 (2)	1 (0)
n-Oktan	100 (2)	46 (14)	5 (0)
n-Nonan	100 (8)	11 (4)	1 (0)
n-Dekan	100 (6)	16 (6)	2 (0)
n-Undekan	100 (2)	129 (43)	1 (0)
n-Dodekan	100 (27)	18 (6)	8 (1)
n-Tridekan	100 (13)	4 (2)	1 (0)
n-Tetradekan	100 (45)	18 (7)	20 (2)
2-Methylbutan	100 (9)	5 (6)	3 (1)
2-Methylpentan	100 (5)	1 (1)	1 (0)
3-Methylpentan	100 (5)	2 (1)	0 (0)
2-Methylhexan	100 (3)	4 (2)	1 (0)
3-Methylhexan	100 (3)	3 (2)	0 (0)
3-Methylheptan	100 (3)	6 (2)	0 (0)
3-Methylnonan	100 (4)	9 (5)	1 (0)
3-Methylundekan	100 (10)	10 (4)	3 (0)
Cyclohexan	100 (6)	4 (5)	1 (0)
Methylcyclopentan	100 (6)	4 (4)	1 (0)
Benzen	100 (3)	18 (4)	5 (0)
Ethylbenzen	100 (2)	33 (4)	6 (0)
n-Propylbenzen	100 (5)	29 (4)	4 (0)
m-/p-Xylen	100 (2)	54 (5)	6 (0)
o-Xylen	100 (1)	44 (6)	5 (0)
1,2,3-Trimethylbenzen	100 (6)	25 (4)	3 (0)
1,2,4-Trimethylbenzen	100 (6)	29 (4)	4 (0)
Mesitylen	100 (2)	23 (4)	3 (0)
1-Ethyl-2-methylbenzen	100 (4)	23 (3)	3 (0)
1-Ethyl-3-methylbenzen	100 (4)	29 (3)	4 (0)
1-Ethyl-4-methylbenzen	100 (7)	32 (3)	5 (0)
Cumen	100 (1)	23 (8)	3 (0)
Styren	100 (4)	62 (3)	11 (1)
Phenol	100 (6)	98 (4)	13 (1)
Acetophenon	100 (14)	72 (1)	13 (1)
Propanal	100 (6)	19 (8)	12 (1)
n-Butanal	100 (5)	23 (11)	10 (1)
n-Pentanal	100 (2)	31 (8)	7 (1)
2-Methylpropanal	100 (7)	12 (6)	6 (0)
Ethanol	100 (7)	41 (7)	16 (1)
2-Propanol	100 (10)	52 (5)	7 (1)
1-Butanol	100 (4)	51 (13)	8 (2)
2-Methyl-2-propanol	100 (7)	16 (10)	2 (0)
Aceton	100 (9)	16 (9)	14 (1)
2-Butanon	100 (3)	23 (13)	9 (1)
2-Pentanon	100 (3)	61 (2)	7 (1)
3-Pentanon	100 (2)	39 (7)	8 (1)
2-Hexanon	100 (2)	40 (6)	6 (0)
3-Hexanon	100 (1)	37 (4)	6 (0)
2-Oktanon	100 (4)	51 (2)	6 (1)
Cyclohexanon	100 (6)	73 (4)	10 (1)
Ethylacetat	100 (1)	15 (10)	8 (0)
n-Butylacetat	100 (2)	36 (4)	6 (1)

Kalibrierung für die quantitative Analyse des VOC-Profiles in Zellkulturen mit in-situ-SPME-GC-MS für 73 VOC (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2)

Für den Kalibrierversuch der *in-situ*-Probenahme mit einer Extraktionszeit von 60 min wurde eine Stammlösung mit 73 VOC in Methanol hergestellt und aus dieser fünf Standardlösungen verdünnt, wobei die Stammlösung selber die sechste Standardlösung war (Anhang Tabelle 25, Seite A-27). Die Lagerung dieser Standardlösungen erfolgte in Certan[®]-Flaschen bei -20 °C.

Mit Aktivkohle gereinigte (vgl. VOC-Hintergrundproblematik) Zellkulturflaschen wurden mit 25,0 mL Wasser befüllt und anschließend mit dem Septumdeckel gasdicht verschlossen. Es folgte die Dotierung von 10 µL Methanol (Blindwert) oder Standardlösung (Anhang Tabelle 25). Die vorbereiteten Flaschen wurden bei 37 °C für 1 h inkubiert und anschließend erfolgte die *in-situ*-SPME für 60 min bei 37 °C. Die Thermodesorption der beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems fand sofort nach Extraktionsende statt. Die Desorption erfolgte bei 280 °C für 5 min, wobei das Splitventil nach 3 min geöffnet wurde. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Die Ermittlung der Signalfächen wurde im EIC für substanzspezifische Fragmente durchgeführt (Anhang Tabelle 23, Seite A-24). Der Kalibrierversuch wurde einmal durchgeführt. Zum Vergleich wurde dieser Versuch mit einer Extraktionszeit von 15 min wiederholt. Die Kalibrierfunktionen einiger Substanzen sind in Anhang Abbildung 10 (ab Seite A-28) graphisch dargestellt.

Für die kurzkettigen Alkane, wie z. B. n-Pentan, und Alkene mit fünf und 6 Kohlenstoffatomen zeigten sich bei beiden Extraktionsbedingungen unzureichende Regressionsgeraden, die auf falschen Umgang mit dem VOC-Standard zurückzuführen waren (siehe dazu auch Ausführungen zur Standardherstellung in Kapitel 3.1).

Untersuchung der Vergleichbarkeit bei der parallelen Verwendung mehrerer SPME-Fasern (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2)

Für die Untersuchungen zur Methodencharakterisierung und Kalibrierung der *in-situ*-Probenahme mit der optimierten Extraktionszeit von 15 min wurden Standards mit insgesamt 67 verschiedenen Verbindungen hergestellt aufgeteilt auf vier Sets von Standardlösungen: drei Sets enthielten Methanol als Lösungsmittel und die Essigsäure-Standardlösungen Wasser; je Sets gab es sechs Standardlösungen (Anhang Tabelle 26, Seite A-29). Die Lagerung dieser Standardlösungen erfolgte in Certan[®]-Flaschen bei -20 °C oder 4 °C.

Mit Aktivkohle gereinigte Zellkulturflaschen wurden mit 25,0 mL Wasser befüllt und anschließend mit dem Septumdeckel gasdicht verschlossen. Danach dotierte man je 10 µL des Kalibrierniveaus Nr. 6 (Anhang Tabelle 26, Seite A-29). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C im Trockenschrank wurde die *in-situ*-SPME-Extraktion mit Car/PDMS (75 µm)-Faser für 15 min bei 37 °C durchgeführt. Dieses Vorgehen erfolgte nacheinander mit sechs Car/PDMS-Fasern aus einer Charge.

Die Thermodesorption der beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems fand sofort nach Extraktionsende statt (280 °C für 5 min, Splitventil nach 3 min offen). Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Abweichend von der optimierten Methode kam hierbei eine ZB-624ms-GC-Säule zum Einsatz. Es wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Die Ermittlung der Signalfächen wurde im EIC für substanzspezifische Fragmente durchgeführt (Anhang Tabelle 23, Seite A-24). Der Versuch wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt, so dass für jede Faser eine Dreifachbestimmung vorlag.

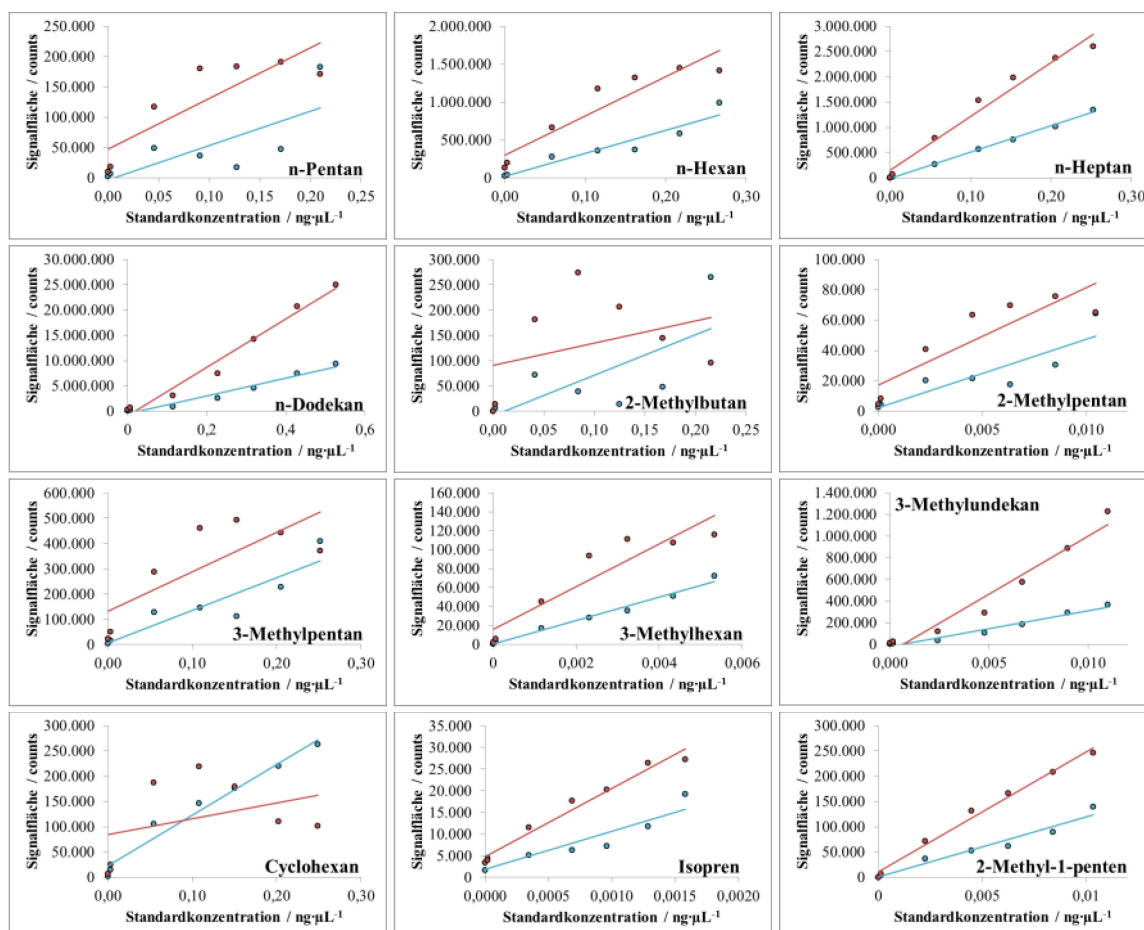
Die Ergebnisse sind in Anhang Tabelle 27 (Seite A-31) dargestellt. Es konnten nur 62 Zielsubstanzen ausgewertet werden. Die als Ersatz für eine gebrochene VF-624ms-Säule verwendete ZB-624ms-Säule ergab für die zu untersuchenden VOC eine geringere Auflösung, so dass vermehrt Koelutionen auftraten und folglich weniger Substanzen ausgewertet werden konnten.

Anhang Tabelle 25: Konzentrationen in ng·µL⁻¹ von 73 VOC in methanolischen Standardgemischen für die *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik in Zellkulturflaschen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

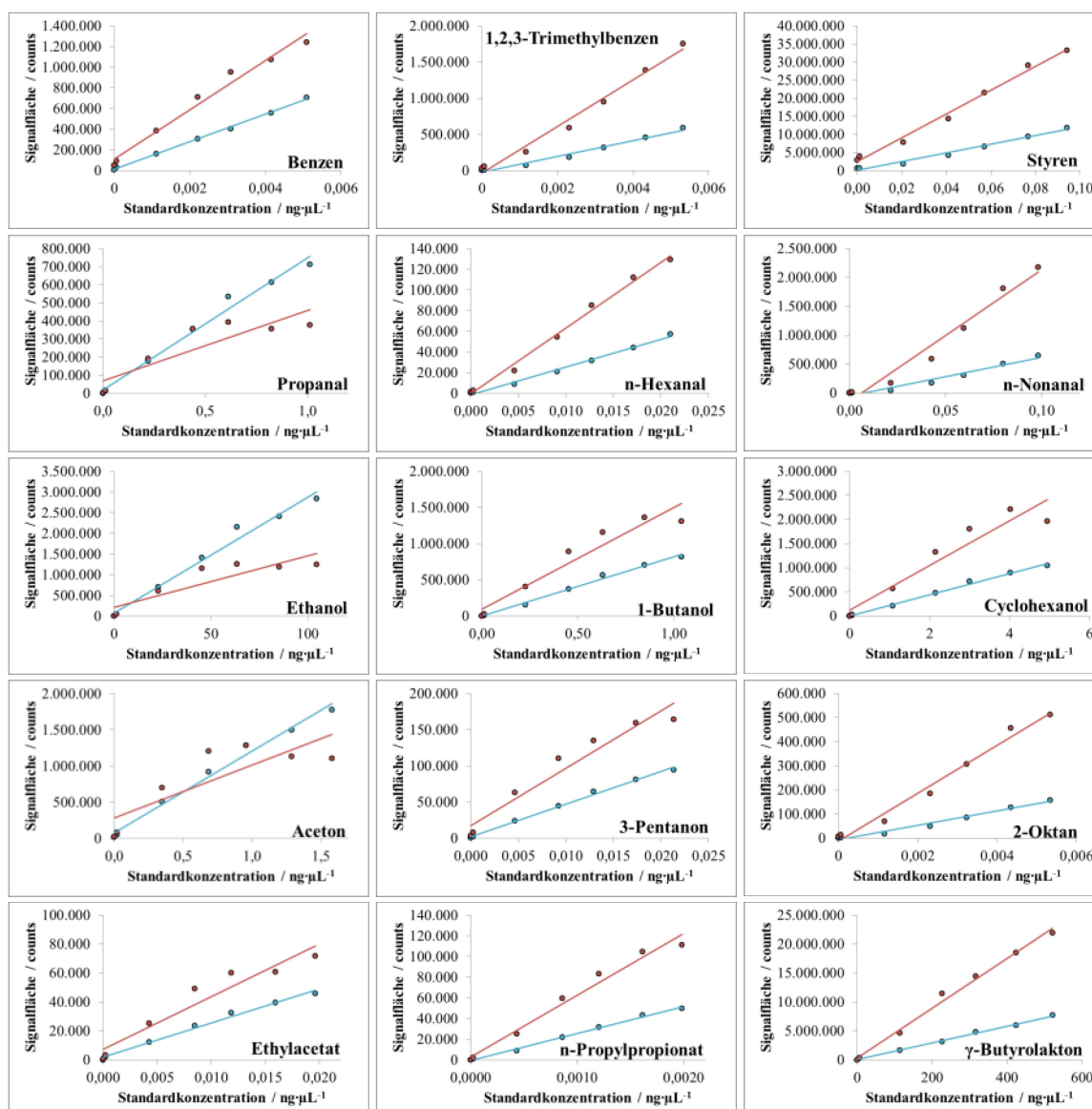
Substanz	Konzentrationsniveau					
	1	2	3	4	5	6
n-Pentan	2,00	37,9	77,3	115	155	199
n-Hexan	2,54	48,3	98,4	147	197	253
n-Heptan	2,41	45,7	93,2	139	186	239
n-Oktan	10,1	191	389	580	778	999
n-Nonan	0,048	0,901	1,85	2,76	3,70	4,75
n-Dekan	4,95	93,9	192	286	383	491
n-Undekan	0,010	0,185	0,377	0,563	0,754	0,968
n-Dodekan	5,01	95,1	194	289	388	498
n-Tridekan	0,965	18,3	37,4	55,7	74,7	95,9
n-Tetradekan	2,12	40,3	81,2	121	162	209
2-Methylbutan	2,16	41,1	83,8	125	167	215
2-Methylpentan	0,100	1,89	3,86	5,76	7,71	9,91
3-Methylpentan	2,40	45,5	92,8	138	186	238
2-Methylhexan	0,050	0,933	1,90	2,84	3,80	4,88
3-Methylhexan	0,051	0,964	1,97	2,93	3,92	5,04
3-Methylheptan	2,41	45,7	93,3	139	186	239
3-Methylnonan	0,202	3,84	7,83	11,7	15,7	20,1
3-Methylundekan	0,105	1,99	4,06	6,05	8,11	10,4
Cyclohexan	2,37	44,9	91,6	137	183	235
Methylcyclopentan	0,853	16,2	33,0	49,3	66,0	84,8
Isopren	0,015	0,286	0,584	0,870	1,17	1,50
2-Methyl-1-penten	0,099	1,87	3,81	5,68	7,62	9,78
2,4-Dimethyl-1-hepten	0,098	1,86	3,79	5,66	7,58	9,74
Ethanol	996	18915	38567	57449	77057	98953
1-Propanol	99,4	1887	3848	5737	7688	9873
2-Propanol	41,3	784	1599	2384	3194	4102
1-Butanol	9,91	188	384	572	766	984
2-Methyl-1-propanol	20,6	392	799	1191	1596	2050
2-Methyl-2-propanol	46,7	887	1809	2698	3615	4642
2-Ethyl-1-hexanol	7,55	143	292	436	584	750
Cyclohexanol	47,1	894	1823	2718	3643	4678
Propanal	9,63	183	373	556	745	957
n-Butanal	2,41	48,8	93,3	139	186	239
n-Pentanal	0,202	3,83	7,80	11,6	15,6	20,0
n-Hexanal	0,200	3,80	7,74	11,5	15,5	19,9
n-Heptanal	2,51	47,7	97,2	145	194	249
n-Oktanal	0,106	2,01	4,10	6,11	8,19	10,5
n-Nonanal	0,936	17,8	36,2	54,0	72,4	93,0
n-Dekanal	2,65	50,3	103	153	205	263
2-Methylpropanal	0,897	17,0	34,7	51,8	69,4	89,1
3-Methylbutanal	0,956	18,2	37,0	55,2	75,0	95,0
2-Methyl-2-propenal	0,100	1,90	3,87	5,78	7,74	9,94
2-Methyl-2-butenal	0,096	1,83	3,73	5,55	7,44	9,56
Aceton	15,1	286	584	871	1167	1498
2-Butanon	9,81	186	380	567	759	975
2-Pentanon	0,019	0,358	0,731	1,09	1,46	1,87
3-Pentanon	0,203	3,86	7,87	11,7	15,7	20,2
2-Hexanon	0,103	1,95	3,97	5,92	7,93	10,2
3-Hexanon	0,051	0,960	1,96	2,92	3,91	5,02
2-Oktanon	0,051	0,967	1,97	2,94	3,94	5,06
Cyclohexanon	2,10	39,9	81,3	121	162	209
Ethylacetat	0,187	3,55	7,23	10,8	14,5	18,6
n-Butylacetat	0,107	2,03	4,15	6,18	8,29	10,6
n-Propylpropionat	0,019	0,359	0,733	1,09	1,46	1,88
Ethylbutyrat	0,049	0,933	1,90	2,84	3,80	4,88
γ-Butyrolakton	4972	94404	192493	286986	384599	493885

Anhang Tabelle 25 (Fortsetzung): Konzentrationen in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ von 73 VOC in methanolischen Standardgemischen für die *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik in Zellkulturflaschen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Konzentrationsniveau					
	1	2	3	4	5	6
Benzen	0,049	0,921	1,88	2,80	3,75	4,82
Ethylbenzen	0,019	0,355	0,723	1,08	1,44	1,86
n-Propylbenzen	0,019	0,359	0,733	1,09	1,45	1,88
o-Xylen	0,009	0,174	0,356	0,531	0,711	0,913
p-Xylen	0,050	0,940	1,92	2,86	3,83	4,92
1,2,3-Trimethylbenzen	0,051	0,964	1,96	2,93	3,93	5,04
1,2,4-Trimethylbenzen	0,101	1,92	3,92	5,85	7,84	10,1
Mesitylen	0,009	0,178	0,363	0,541	0,725	0,931
1-Ethyl-2-methylbenzen	0,050	0,951	1,939	2,89	3,97	4,98
1-Ethyl-3-methylbenzen	0,103	1,95	3,97	5,92	7,94	10,2
1-Ethyl-4-methylbenzen	0,050	0,949	1,93	2,88	3,86	4,96
Styren	0,898	17,0	34,7	51,8	69,4	89,2
Cumen	0,009	0,179	0,364	0,543	0,727	0,934
Acetophenon	2,50	47,4	96,7	144	193	248
Phenol	52,1	989	2017	3008	4031	5176
Benzaldehyd	2,52	47,8	97,5	145	195	250
Pyrrol	2,43	46,2	94,1	140	188	242



Anhang Abbildung 10: Kalibriergeraden von ausgewählten VOC im Kalibrierversuch für insgesamt 73 VOC der *in-situ*-SPME-GC-MS im HS in Zellkulturflaschen mit einer Extraktionszeit von 60 min (rot) und 15 min (blau); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2



Anhang Abbildung 10 (Fortsetzung): Kalibriergeraden von ausgewählten VOC im Kalibrierversuch für insgesamt 73 VOC der *in-situ*-SPME-GC-MS im HS in Zellkulturflaschen mit einer Extraktionszeit von 60 min (rot) und 15 min (blau); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Anhang Tabelle 26: Konzentration von 67 VOC in $\text{ng-}\mu\text{L}^{-1}$ in einem Set von Standardlösungen für die Kalibrierung der *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik im HS in Zellkulturflaschen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Stamm lösung ^a	Konzentrationsniveau					
		1	2	3	4	5	6
n-Pentan	M1	2,34	10,1	21,1	34,8	46,9	58,9
n-Hexan	M1	1,80	7,80	16,2	26,8	36,1	45,4
n-Heptan	M2	4,18	16,8	35,6	52,8	72,9	91,1
n-Oktan	M2	22,1	88,7	188	279	386	482
n-Nonan	M2	0,099	0,395	0,838	1,24	1,72	2,15
n-Dekan	M2	10,4	41,8	88,7	132	182	227
n-Dodekan	M2	12,1	48,7	103	153	212	264
n-Tridekan	M2	4,47	17,9	38,0	56,4	77,9	97,3
n-Tetradekan	M2	14,0	56,0	119	176	244	304
2-Methylbutan	M1	11,8	50,8	106	175	235	296
2-Methylpentan	M1	2,30	9,93	20,6	34,2	46,0	57,8
3-Methylpentan	M1	0,393	1,70	3,53	5,84	7,86	9,88

a: Substanz wurde in einer der drei methanolischen Standardlösungen M1, M2, M3 oder der wässrigen Standardlösung W eingebracht, b: Korrektur der Konzentration mit der vom Hersteller angegebenen Reinheit des Standards

Anhang Tabelle 26 (Fortsetzung): Konzentration von 67 VOC in ng- μL^{-1} in einem Set von Standardlösungen für die Kalibrierung der *in-situ*-SPME-GC-MS-Analytik im HS in Zellkulturflaschen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Stamm lösung ^a	Konzentrationsniveau					
		1	2	3	4	5	6
2-Methylhexan	M2	0,883	3,54	7,51	11,2	15,4	19,2
3-Methylhexan	M2	0,871	3,49	7,41	11,0	15,2	19,0
3-Methylheptan	M2	0,831	3,33	7,07	10,5	14,5	18,1
3-Methylnonan	M2	0,887	3,56	7,54	11,2	15,5	19,3
3-Methylundekan	M2	0,457	1,83	3,89	5,77	7,97	9,95
Cyclohexan	M1	0,438	1,90	3,94	6,52	8,77	11,0
Methylcyclopentan	M1	1,45	6,26	13,0	21,5	28,9	36,4
2-Methyl-1-penten	M1	0,263	1,14	2,37	3,91	5,27	6,62
2,4-Dimethyl-1-hepten	M2	0,225	0,901	1,91	2,84	3,92	4,89
Ethanol	M3	440	18763	37540	56453	73386	101342
1-Propanol	M2	220	884	1875	2784	3845	4801
2-Propanol	M2	219	879	1865	2769	3824	4775
1-Butanol	M2	22,9	91,7	195	289	399	498
2-Methyl-2-propanol	M2	403	1615	3427	5088	7027	8774
2-Ethyl-1-hexanol	M2	25,1	101	213	317	438	547
Cyclohexanol	M2	47,6	191	405	602	831	1037
Propanal	M2	8,92	35,8	75,9	113	156	194
n-Butanal	M2	0,429	1,72	3,65	5,42	7,48	9,34
n-Pentanal	M2	0,868	3,48	7,38	11,0	15,1	18,9
n-Hexanal	M2	0,891	3,57	7,58	11,3	15,5	19,4
n-Heptanal	M2	0,917	3,68	7,80	11,6	16,0	20,0
n-Oktanal	M2	1,01	4,06	8,62	12,8	17,7	22,1
n-Nonanal	M2	4,14	16,6	35,2	52,3	72,2	90,2
n-Dekanal	M2	4,80	19,2	40,8	60,6	83,7	105
3-Methylbutanal	M2	4,38	17,6	37,2	55,3	76,4	95,4
2-Methyl-2-propenal	M2	0,227	0,910	1,93	2,87	3,96	4,94
2-Methyl-2-butenal	M2	0,441	1,77	3,75	5,57	7,69	9,60
Aceton	M2	132	529	1123	1667	2302	2875
2-Butanon	M2	44,1	177	375	557	769	960
2-Pentanon	M2	0,435	1,74	3,70	5,49	7,59	9,47
3-Pentanon	M2	0,890	3,57	7,57	11,2	15,5	19,4
2-Hexanon	M2	0,867	3,48	7,37	10,9	15,1	18,9
3-Hexanon	M2	0,434	1,74	3,70	5,49	7,58	9,46
2-Oktanon	M2	0,913	3,66	7,77	11,5	15,9	19,9
Cyclohexanon	M2	13,3	53,3	113	168	232	290
Ethylacetat	M2	2,14	8,59	18,2	27,1	37,4	46,7
n-Butylacetat	M2	0,435	1,74	3,70	5,49	7,59	9,47
Ethylbutyrat	M2	0,435	1,74	3,70	5,49	7,58	9,46
Essigsäure	W	6007	24455	49230	72483	98113	123390
Benzen	M2	0,244	0,977	2,07	3,08	4,25	5,31
Ethylbenzen	M2	0,249	0,997	2,12	3,14	4,34	5,42
n-Propylbenzen	M2	0,259	1,04	2,21	3,28	4,52	5,65
o-Xylen	M2	0,099	0,396	0,841	1,25	1,72	2,15
p-Xylen	M2	0,239	0,958	2,03	3,02	4,17	5,20
1,2,3-Trimethylbenzen ^b	M2	0,435	1,75	3,70	5,50	7,59	9,48
1,2,4-Trimethylbenzen	M2	0,817	3,28	6,95	10,3	14,3	17,8
Mesitylen	M2	0,245	0,983	2,09	3,10	4,28	5,34
1-Ethyl-2-methylbenzen	M2	0,240	0,962	2,04	3,03	4,19	5,23
1-Ethyl-3-methylbenzen	M2	0,444	1,78	3,77	5,60	7,74	9,66
1-Ethyl-4-methylbenzen	M2	0,228	0,914	1,94	2,88	3,98	4,97
Cumen	M2	0,106	0,425	0,903	1,34	1,85	2,31
Styren	M2	4,31	17,3	36,6	54,4	75,1	93,8
Acetophenon	M2	10,7	42,8	90,9	135	186	233
Phenol	M3	11,7	500	999	1503	1954	2698
Pyrrol	M2	2,02	8,11	17,2	25,5	35,3	44,0

a: Substanz wurde in einer der drei methanolischen Standardlösungen M1, M2, M3 oder der wässrigen Standardlösung W eingebracht, b: Korrektur der Konzentration mit der vom Hersteller angegebenen Reinheit des Standards

Anhang Tabelle 27: Vergleich von sechs Car/PDMS-Fasern (75 µm) einer Charge bei der Bestimmung von VOC im HS in Zellkulturflaschen mit *in-situ*-SPME-GC-MS, Angabe als Signalfächen / counts in der Form Mittelwert n=3 (relative Standardabweichung / %); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Faser Nr. 1		Faser Nr. 2		Faser Nr. 3	
n-Pentan	528849	(9)	427911	(8)	443036	(11)
n-Hexan	1378157	(14)	1098241	(5)	1099245	(8)
n-Heptan	2528599	(4)	2156867	(4)	2056712	(7)
n-Oktan	11406036	(5)	11509607	(2)	10490736	(8)
n-Nonan	81669	(6)	97031	(5)	87045	(6)
n-Dekan	261068	(17)	316754	(1)	278534	(13)
n-Dodekan	734875	(27)	933849	(12)	897516	(11)
n-Tridekan	116943	(40)	145516	(16)	151219	(13)
n-Tetradekan	165600	(43)	216548	(19)	220214	(10)
2-Methylbutan	1460344	(12)	1113171	(10)	1168364	(11)
2-Methylpentan	1514340	(8)	1262328	(7)	1267491	(9)
3-Methylpentan	249257	(13)	212427	(9)	217594	(5)
2-Methylhexan	465860	(3)	414312	(4)	381093	(9)
3-Methylhexan	367841	(4)	327975	(2)	305618	(6)
3-Methylheptan	550995	(4)	521535	(3)	476726	(8)
3-Methylnonan	374016	(12)	438520	(1)	388864	(11)
3-Methylundekan	45694	(27)	59741	(29)	56667	(12)
Cyclohexan	146600	(9)	108905	(7)	118193	(6)
Methylcyclopentan	1164792	(8)	980976	(7)	1010157	(9)
2-Methyl-1-penten	127333	(5)	118837	(5)	117864	(6)
Benzen	601758	(6)	526704	(3)	488479	(7)
Ethylbenzen	780369	(5)	787772	(4)	721331	(6)
n-Propylbenzen	475127	(7)	542461	(3)	484418	(9)
o-Xylen	217318	(6)	233933	(2)	212897	(10)
p-Xylen	464460	(7)	502709	(3)	456050	(9)
1,2,3-Trimethylbenzen	395070	(10)	471764	(3)	430557	(10)
1,2,4-Trimethylbenzen	397911	(6)	466649	(6)	428586	(5)
Mesitylen	411349	(8)	466156	(3)	430069	(8)
1-Ethyl-2-methylbenzen	411359	(7)	469982	(4)	427354	(8)
1-Ethyl-3-methylbenzen	1006292	(6)	1145655	(5)	1041845	(7)
1-Ethyl-4-methylbenzen	1008664	(6)	1144133	(5)	1040808	(7)
Cumen	265804	(8)	285252	(1)	261909	(12)
Styren	4523964	(6)	4929138	(7)	4535546	(4)
Phenol	379555	(3)	464226	(12)	435532	(14)
Acetophenon	244241	(9)	278332	(2)	251119	(9)
Pyrol	18457	(7)	20077	(11)	18593	(14)
Propanal	157837	(6)	130231	(6)	125404	(6)
n-Butanal	31760	(10)	30250	(10)	29344	(9)
n-Pentanal	125279	(6)	125546	(5)	117573	(5)
n-Hexanal	25098	(7)	28118	(1)	25415	(9)
n-Heptanal	15831	(10)	18830	(3)	16849	(13)
n-Oktanal	26616	(11)	32500	(1)	29132	(12)
n-Nonanal	126926	(13)	158582	(9)	143506	(11)
n-Dekanal	64744	(13)	79224	(14)	72877	(9)
2-Methyl-2-propenal	32739	(7)	28195	(5)	26500	(8)
Ethanol	2463431	(8)	1941066	(8)	1976016	(7)
1-Propanol	351813	(8)	300986	(5)	289395	(7)
2-Propanol	1881294	(8)	1521513	(6)	1458839	(7)
1-Butanol	279577	(7)	255670	(6)	250438	(7)
2-Methyl-2-propanol	4308491	(7)	3222754	(5)	3179996	(7)
2-Ethyl-1-hexanol	1285787	(11)	1524742	(4)	1350436	(10)
Cyclohexanol	158140	(11)	149933	(4)	142601	(6)
Aceton	4758340	(6)	4010908	(5)	3797722	(6)
2-Butanon	1463549	(5)	1307038	(4)	1234934	(6)
3-Pentanon	58710	(5)	53053	(6)	50082	(8)
2-Hexanon	37622	(7)	34320	(1)	32407	(7)
3-Hexanon	43646	(6)	41610	(3)	37648	(8)
2-Oktanon	177712	(10)	209134	(5)	183792	(9)
Cyclohexanon	260140	(5)	267461	(3)	251102	(7)
Ethylacetat	77041	(5)	68930	(5)	63005	(6)
n-Butylacetat	42269	(8)	38288	(5)	36291	(4)
Ethylbutyrat	30808	(4)	29350	(4)	26705	(5)

Anhang Tabelle 27 (Fortsetzung): Vergleich von sechs Car/PDMS-Fasern (75 µm) einer Charge bei der Bestimmung von VOC im HS in Zellkulturflaschen mit in-situ-SPME-GC-MS, Angabe als Signalfächen / counts in der Form Mittelwert n=3 (relative Standardabweichung / %); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Faser Nr. 4	Faser Nr. 5	Faser Nr. 6
n-Pentan	425828 (7)	417707 (6)	370030 (12)
n-Hexan	1070450 (6)	1053093 (4)	1078224 (11)
n-Heptan	2075437 (5)	2060520 (6)	2108447 (7)
n-Oktan	10727565 (2)	10822536 (1)	11339955 (4)
n-Nonan	87922 (2)	90494 (2)	104415 (3)
n-Dekan	305251 (6)	294904 (3)	340180 (6)
n-Dodekan	1030828 (6)	1015330 (1)	926689 (5)
n-Tridekan	177346 (10)	179831 (5)	156028 (9)
n-Tetradekan	268585 (9)	277157 (3)	235710 (7)
2-Methylbutan	1167677 (9)	1093624 (9)	829010 (12)
2-Methylpentan	1236803 (9)	1213602 (6)	1186313 (10)
3-Methylpentan	205482 (4)	202668 (11)	197854 (12)
2-Methylhexan	395500 (3)	392434 (4)	399699 (5)
3-Methylhexan	317477 (4)	315227 (4)	324369 (6)
3-Methylheptan	491086 (4)	489657 (2)	509726 (5)
3-Methylnonan	407275 (3)	403657 (2)	477196 (4)
3-Methylundekan	63328 (9)	60852 (2)	57204 (7)
Cyclohexan	120149 (6)	109871 (2)	97290 (12)
Methylcyclopentan	982158 (6)	944273 (6)	892209 (10)
2-Methyl-1-penten	117040 (6)	114249 (4)	125861 (9)
Benzen	502815 (5)	492708 (4)	502591 (2)
Ethylbenzen	728963 (5)	739275 (3)	775054 (5)
n-Propylbenzen	493596 (1)	508102 (2)	598633 (3)
o-Xylen	212507 (3)	222683 (2)	238041 (2)
p-Xylen	460329 (2)	479825 (2)	520359 (3)
1,2,3-Trimethylbenzen	437095 (2)	447523 (2)	502956 (2)
1,2,4-Trimethylbenzen	434233 (4)	438317 (3)	507300 (3)
Mesitylen	425916 (0)	445176 (2)	488358 (2)
1-Ethyl-2-methylbenzen	428418 (2)	440106 (2)	505244 (3)
1-Ethyl-3-methylbenzen	1045987 (4)	1080298 (2)	1270902 (3)
1-Ethyl-4-methylbenzen	1046127 (3)	1083345 (2)	1271687 (3)
Cumen	262825 (1)	272513 (2)	297377 (2)
Styren	4529266 (8)	4649472 (4)	5250479 (6)
Phenol	616350 (50)	402746 (2)	416248 (4)
Acetophenon	264714 (2)	268473 (3)	310520 (3)
Pyrol	18485 (4)	18665 (8)	21359 (2)
Propanal	136848 (6)	128525 (3)	90583 (6)
n-Butanal	28798 (8)	28369 (10)	27873 (9)
n-Pentanal	118142 (8)	119295 (4)	122624 (2)
n-Hexanal	26699 (6)	27660 (3)	29446 (0)
n-Heptanal	17674 (4)	18169 (4)	20331 (5)
n-Oktanal	31069 (4)	31577 (2)	38628 (5)
n-Nonanal	158248 (4)	159707 (2)	171644 (3)
n-Dekanal	82488 (5)	83048 (3)	84388 (4)
2-Methyl-2-propenal	27577 (5)	26648 (1)	27520 (7)
Ethanol	2031108 (6)	1873429 (4)	1278871 (8)
1-Propanol	306940 (7)	294211 (5)	258057 (7)
2-Propanol	1588371 (6)	1499954 (4)	1193794 (8)
1-Butanol	258299 (7)	255066 (4)	248439 (5)
2-Methyl-2-propanol	3470434 (6)	3256472 (4)	2720531 (9)
2-Ethyl-1-hexanol	1385165 (3)	1434065 (4)	1613355 (3)
Cyclohexanol	149903 (6)	148587 (5)	145884 (6)
Aceton	4121737 (7)	3899086 (2)	2930785 (7)
2-Butanon	1295783 (6)	1276355 (3)	1230059 (4)
3-Pentanon	53556 (5)	52401 (2)	51674 (3)
2-Hexanon	34010 (6)	33451 (5)	33329 (2)
3-Hexanon	39502 (3)	39441 (3)	39617 (4)
2-Oktanon	191696 (3)	194433 (2)	229899 (3)
Cyclohexanon	258281 (5)	258685 (2)	271221 (1)
Ethylacetat	66357 (7)	65687 (5)	63879 (5)
n-Butylacetat	37307 (6)	36899 (5)	36401 (8)
Ethylbutyrat	28835 (10)	27982 (7)	27238 (10)

Einfluss des SPME-Fasertransportes auf das analysierte VOC-Profil der Zellkulturen (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2)

Mit Aktivkohle gereinigte Zellkulturflaschen wurden mit 25,0 mL Wasser befüllt und anschließend mit dem Septumdeckel gasdicht verschlossen. Danach kamen je 10 µL des Kalibrierniveaus Nr. 6 der in Anhang Tabelle 26 (Seite A-29) angegebenen methanolischen und wässrigen Standardlösungen hinzu. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C im Trockenschrank wurde eine *in-situ*-SPME-Extraktion mit Car/PDMS (75 µm)-Faser für 15 min bei 37 °C durchgeführt. Entweder wurde die beladene SPME-Faser anschließend direkt im Injektor des GC-MS-Systems desorbiert (0 h) oder vorher für 3, 6 oder 9 h in Glasgefäßen auf Trockeneis aufbewahrt.

Die Desorption erfolgte bei 280 °C für 5 min, wobei das Splitventil nach 3 min geöffnet wurde. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Es wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Die Ermittlung der Signalflächen wurde im EIC für substanzspezifische Fragmente durchgeführt (Anhang Tabelle 23, Seite A-24). Die Auswertung erfolgte für 66 VOC. Es erfolgte keine Auswertung für 2-Methylbutan, da in einigen der Durchführungen die MS-Datenaufzeichnung aus ungeklärten Gründen zu spät einsetzte. Folglich wurde 2-Methylbutan nur teilweise detektiert, so dass sich Minderbefunde ergaben. Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Ergebnisse sind in Anhang Tabelle 28 zusammengefasst.

Anhang Tabelle 28: Wiederfindungen (%) von VOC bei der Lagerung von beladenen SPME-Fasern in verschraubbaren Gläsern auf Trockeneis für verschiedene Zeiten von 0 bis 9 h, Mittelwert n=3 (Standardabweichung); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	0 h	3 h	6 h	9 h
n-Pentan	100 (12)	90 (10)	89 (4)	93 (3)
n-Hexan	100 (10)	98 (6)	94 (1)	95 (5)
n-Heptan	100 (6)	108 (0)	99 (4)	100 (1)
n-Oktan	100 (5)	110 (6)	95 (7)	100 (4)
n-Nonan	100 (24)	113 (20)	93 (12)	103 (9)
n-Dekan	100 (31)	115 (27)	94 (14)	104 (14)
n-Dodekan	100 (40)	85 (19)	85 (15)	95 (3)
n-Tridekan	100 (39)	78 (19)	83 (15)	94 (5)
n-Tetradekan	100 (41)	77 (19)	84 (14)	96 (12)
2-Methylpentan	100 (16)	90 (12)	88 (3)	89 (3)
3-Methylpentan	100 (15)	91 (11)	89 (0)	91 (8)
2-Methylhexan	100 (11)	100 (5)	92 (1)	97 (2)
3-Methylhexan	100 (11)	96 (2)	90 (3)	91 (3)
3-Methylheptan	100 (3)	95 (1)	88 (2)	90 (4)
3-Methylnonan	100 (27)	120 (25)	97 (12)	105 (11)
3-Methylundekan	100 (36)	98 (20)	95 (14)	106 (5)
Cyclohexan	100 (23)	94 (19)	95 (2)	98 (4)
Methylcyclopentan	100 (15)	88 (11)	89 (4)	92 (6)
2-Methyl-1-penten	100 (7)	101 (4)	91 (2)	94 (3)
2,4-Dimethyl-1-hepten	100 (8)	105 (6)	91 (7)	95 (7)
Benzen	100 (5)	100 (4)	97 (1)	98 (4)
Ethylbenzen	100 (5)	110 (5)	98 (6)	105 (3)
n-Propylbenzen	100 (15)	118 (15)	97 (9)	105 (7)
o-Xylen	100 (8)	110 (7)	97 (5)	105 (4)
p-Xylen	100 (8)	114 (9)	99 (8)	105 (4)
1,2,3-Trimethylbenzen	100 (21)	112 (12)	100 (8)	107 (8)
1,2,4-Trimethylbenzen	100 (19)	118 (13)	101 (10)	110 (8)
Mesitylen	100 (15)	117 (11)	105 (8)	111 (4)
1-Ethyl-2-methylbenzen	100 (16)	116 (13)	100 (9)	107 (6)
1-Ethyl-3-methylbenzen	100 (13)	122 (11)	101 (8)	108 (9)
1-Ethyl-4-methylbenzen	100 (17)	126 (16)	107 (16)	116 (14)
Cumen	100 (9)	112 (9)	97 (7)	105 (5)
Styren	100 (8)	115 (4)	99 (8)	110 (7)

Anhang Tabelle 28 (Fortsetzung): Wiederfindungen (%) von VOC bei der Lagerung von beladenen SPME-Fasern in verschraubbaren Gläsern auf Trockeneis für verschiedene Zeiten von 0 bis 9 h, Mittelwert n=3 (Standardabweichung); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	0 h	3 h	6 h	9 h
Phenol	100 (13)	107 (2)	284 (90)	205 (46)
Acetophenon	100 (20)	106 (7)	90 (10)	109 (5)
Pyrrol	100 (12)	267 (13)	229 (26)	208 (36)
Propanal	100 (4)	82 (15)	98 (2)	105 (3)
n-Butanal	100 (3)	97 (7)	102 (2)	109 (5)
n-Pentanal	100 (2)	107 (2)	102 (7)	109 (5)
n-Hexanal	100 (8)	111 (5)	104 (8)	115 (6)
n-Heptanal	100 (21)	124 (14)	107 (12)	121 (9)
n-Oktanal	100 (32)	123 (19)	98 (15)	121 (9)
n-Nonanal	100 (40)	108 (12)	92 (15)	115 (8)
n-Dekanal	100 (43)	99 (3)	89 (15)	113 (7)
3-Methylbutanal	100 (10)	98 (5)	94 (5)	99 (5)
2-Methyl-2-propenal	100 (14)	111 (2)	113 (3)	117 (1)
2-Methyl-2-butenal	100 (7)	118 (9)	113 (11)	126 (6)
Ethanol	100 (5)	74 (19)	97 (6)	102 (5)
1-Propanol	100 (12)	90 (11)	92 (3)	102 (7)
2-Propanol	100 (13)	87 (21)	93 (3)	98 (6)
1-Butanol	100 (3)	101 (4)	104 (8)	108 (9)
2-Methyl-2-propanol	100 (21)	77 (18)	84 (3)	89 (10)
2-Ethyl-1-hexanol	100 (22)	118 (13)	102 (18)	119 (10)
Cyclohexanol	100 (5)	102 (5)	101 (9)	107 (9)
Aceton	100 (6)	83 (14)	95 (3)	101 (4)
2-Butanon	100 (7)	97 (5)	97 (4)	102 (7)
2-Pentanon	100 (5)	105 (4)	105 (7)	112 (7)
3-Pentanon	100 (5)	104 (4)	104 (3)	109 (7)
2-Hexanon	100 (8)	105 (2)	102 (4)	115 (7)
3-Hexanon	100 (5)	98 (5)	97 (8)	104 (7)
2-Oktanon	100 (18)	125 (16)	104 (14)	119 (11)
Cyclohexanon	100 (1)	105 (3)	107 (8)	113 (6)
Essigsäure	100 (4)	83 (8)	112 (21)	88 (13)
Ethylacetat	100 (5)	99 (2)	99 (2)	105 (5)
n-Butylacetat	100 (0)	101 (5)	105 (6)	113 (5)
Ethylbutyrat	100 (6)	110 (3)	109 (7)	117 (7)

Zweiter Kalibrierversuch in Zellkulturen mit in-situ-SPME-GC-MS zur Bestimmung von 67 VOC (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2)

Sechs Kalibrierungen wurden mit je einer Car/PDMS-Faser durchgeführt. Dafür erfolgte das Befüllen von mit Aktivkohle gereinigten Zellkulturflaschen mit 25,0 mL Wasser und anschließend der gasdichte Verschluss mit dem Septumdeckel. Es schloss sich die Dotierung mit 10 µL Methanol und Wasser (Blindwert) oder aller Standardlösungen eines Konzentrationsniveaus (Anhang Tabelle 26, Seite A-29) an. Pro Faser und für sechs Konzentrationsniveaus plus Blindwert wurden folglich sieben Flaschen vorbereitet. Diese wurden bei 37 °C für 1 h im Trockenschrank inkubiert und anschließend folgte die *in-situ*-SPME für 15 min bei 37 °C.

Die Thermodesorption der beladenen SPME-Fasern im Injektor des GC-MS-Systems fand sofort nach Extraktionsende (280 °C für 5 min, Splitventil nach 3 min offen). Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Es wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Die Signalfächen wurde im EIC für substanzspezifische Fragmente ermittelt (Anhang Tabelle 23, Seite A-24).

Die Regression erfolgte für jede Kalibrierung mit jeder Faser separat und wurde für jede Substanz entweder linear oder quadratisch ausgewertet (Anhang Tabelle 29, Seite A-35). Ein Bestimmtheitsmaß

unter 0,96 für mindestens eine Faser wurde als unzureichend eingestuft und es erfolgte keine Quantifizierung dieses Stoffes.

Die Ergebnisse für Faser 2 ergab schlechte Regressionskoeffizienten vor allem für die später eluierenden Substanzen, da wahrscheinlich Reste von Aktivkohle in der Zellkulturflasche bei Standardlösung Nr. 3 verblieben waren. Deswegen wurde die Kalibrierung unter Einsatz von Faser 2 für die Standardlösungen Nr. 2-6 wiederholt, die Proportionalität für diesen Bereich belegt und in der ersten Auswertung der fehlerhafte Kalibrierpunkt Nr. 3 für die später eluierenden Substanzen gestrichen. Bei Einsatz von Faser 8 erfolgte bei Kalibrierpunkt Nr. 3 versehentlich die Dotierung von 25 µL anstelle von 10 µL Standard M3. Deswegen wurde dieser Punkt wiederholt und die Signalintensität für Ethanol aus der Wiederholungsanalyse für die Auswertung der Kalibrierung verwendet.

Die Ermittlung der Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) erfolgte aus dem Kalibrierpunkt 1 der Faser Nr. 2 durch Extrapolation auf ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 1:3. In Anhang Tabelle 30 (Seite A-36) sind die Ergebnisse der Kalibrierung für 67 VOC zusammengefasst.

Anhang Tabelle 29: Bestimmtheitsmaße für sechs separat kalibrierte SPME-Fasern für die quantitative VOC-Bestimmung mit *in-situ*-SPME-GC-MS im HS von Zellkulturen auf Basis einer linearen Funktion oder quadratischen Funktion (²); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Bestimmtheitsmaß R ² für Faser Nr.					
	2	3	4	5	6	8
n-Pentan	0,9973	0,9986	0,9881	0,9983	0,9993	0,9944
n-Hexan	0,9983	0,9981	0,9991	0,9968	0,9972	0,9987
n-Heptan	0,9994	0,9927	0,9900	0,9901	0,9908	0,9948
n-Oktan	0,9913	0,9803	0,9778	0,9836	0,9638	0,9923
n-Nonan	0,9875	0,9949	0,9911	0,9931	0,9967	0,9852
n-Dekan	0,9903	0,9944	0,9912	0,9947	0,9932	0,9882
<i>n</i> -Dodekan	0,8057	0,9935	0,9557	0,9856	0,9784	0,9839
<i>n</i> -Tridekan	0,7031	0,9919	0,9436	0,9674	0,9485	0,9817
<i>n</i> -Tetradekan	0,4297	0,9893	0,9111	0,9419	0,9375	0,9809
2-Methylbutan	0,9952	0,9980	0,9944	0,9922	0,9965	0,9954
2-Methylpentan	0,9985	0,9982	0,9986	0,9974	0,9866	0,9973
3-Methylpentan	0,9972	0,9950	0,9971	0,9946	0,9923	0,9976
2-Methylhexan	0,9929	0,9894	0,9885	0,9888	0,9912	0,9954
3-Methylhexan	0,9905	0,9887	0,9925	0,9871	0,9853	0,9857
3-Methylheptan	0,9885	0,9974	0,9983	0,9988	0,9963	0,9969
3-Methylnonan	0,9937	0,9918	0,9934	0,9925	0,9921	0,9878
3-Methylundekan	0,9135	0,9866	0,9593	0,9791	0,9773	0,9794
Cyclohexan	0,9949	0,9902	0,9951	0,9906	0,9874	0,9844
Methylcyclopentan	0,9945	0,9904	0,9967	0,9860	0,9875	0,9910
2-Methyl-1-penten	0,9988	0,9990	0,9988	0,9974	0,9976	0,9990
2,4-Dimethyl-1-hepten	0,9917	0,9913	0,9956	0,9968	0,9957	0,9917
Benzen	0,9985	0,9941	0,9932	0,9901	0,9965	0,9982
Ethylbenzen	0,9980	0,9989	0,9923	0,9990	0,9996	0,9927
o-Xylen	0,9842	0,9917	0,9922	0,9986	0,9993	0,9890
m/p-Xylen	0,9934	0,9961	0,9919	0,9965	0,9981	0,9894
Styren	0,9950	0,9994	0,9812	0,9982	0,9997	0,9916
Cumen	0,9966	0,9977	0,9935	0,9981	0,9989	0,9928
n-Propylbenzen	0,9855	0,9920	0,9881	0,9920	0,9942	0,9829
1-Ethyl-2-methylbenzen	0,9746	0,9937	0,9858	0,9937	0,9965	0,9868
1-Ethyl-3-methylbenzen	0,9883	0,9930	0,9897	0,9914	0,9960	0,9820
1-Ethyl-4-methylbenzen	0,9876	0,9911	0,9815	0,9830	0,9954	0,9794
1,2,3-Trimethylbenzen	0,9401	0,9909	0,9723	0,9887	0,9908	0,9812
1,2,4-Trimethylbenzen	0,9510	0,9921	0,9776	0,9909	0,9941	0,9810
Mesitylen	0,9810	0,9964	0,9874	0,9961	0,9980	0,9873

kursiv: Methode für quantitative Bestimmung dieser Substanzen aufgrund zu schlechter Güte der Regressionsfunktion (Bestimmtheitsmaß für mindestens eine Faser <0,96) nicht geeignet, ²: Anwendung eines quadratischen Regressionsmodells

Anhang Tabelle 29 (Fortsetzung): Bestimmtheitsmaße für sechs separat kalibrierte SPME-Fasern für die quantitative VOC-Bestimmung mit *in-situ*-SPME-GC-MS im HS von Zellkulturen auf Basis einer linearen Funktion oder quadratischen Funktion (²); Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Bestimmtheitsmaß R ² für Faser Nr.					
	2	3	4	5	6	8
Phenol	0,9865	0,9886	0,9642	0,9736	0,9876	0,8255
Acetophenon ²	0,9919	0,9993	0,9805	0,9994	0,9954	0,9982
Pyrrol	0,9895	0,9936	0,9912	0,9936	0,9983	0,9858
Propanal	0,9904	0,9922	0,9890	0,9849	0,9855	0,9911
n-Butanal	0,9973	0,9968	0,9888	0,9979	0,9900	0,9989
n-Pentanal	0,9990	0,9994	0,9926	0,9996	0,9975	0,9932
n-Hexanal ²	0,9914	0,9994	0,9881	0,9998	0,9991	0,9957
n-Heptanal ²	0,9969	0,9992	0,9948	0,9997	0,9984	0,9986
n-Oktanal ²	0,9700	0,9996	0,9842	0,9997	0,9984	0,9981
n-Nonanal ²	0,9439	0,9993	0,9767	0,9997	0,9985	0,9950
n-Dekanal ²	0,9084	0,9977	0,9695	0,9983	0,9980	0,9850
3-Methylbutanal	0,9927	0,9914	0,9876	0,9926	0,9862	0,9960
2-Methyl-2-propenal	0,9993	0,9973	0,9982	0,9980	0,9952	0,9989
2-Methyl-2-butenal	0,9901	0,9944	0,9903	0,9924	0,9985	0,9828
Ethanol	0,9902	0,9855	0,9836	0,9792	0,9898	0,9819
1-Propanol	0,9948	0,9950	0,9839	0,9955	0,9893	0,9979
2-Propanol	0,9898	0,9906	0,9821	0,9880	0,9829	0,9945
1-Butanol	0,9912	0,9995	0,9889	0,9881	0,9958	0,9788
2-Methyl-2-propanol ²	0,9994	0,9979	0,9980	0,9987	0,9958	0,9987
2-Ethyl-1-hexanol ²	0,9946	0,9985	0,9665	0,9997	0,9899	0,9953
Cyclohexanol	0,9950	0,9974	0,9841	0,9813	0,9925	0,9818
Aceton	0,9899	0,9879	0,9774	0,9784	0,9773	0,9838
2-Butanon	0,9907	0,9912	0,9789	0,9910	0,9811	0,9925
2-Pentanon	0,9999	0,9996	0,9876	0,9994	0,9962	0,9952
3-Pentanon	0,9997	0,9997	0,9875	0,9998	0,9933	0,9971
2-Hexanon	0,9915	0,9993	0,9815	0,9975	0,9983	0,9876
3-Hexanon	0,9922	0,9990	0,9815	0,9969	0,9987	0,9902
2-Oktanon ²	0,9846	0,9998	0,9794	0,9997	0,9977	0,9979
Cyclohexanon	0,9990	0,9998	0,9796	0,9983	0,9937	0,9914
Essigsäure	0,9920	0,9711	0,9850	0,9853	0,9871	0,9888
Ethylacetat	0,9927	0,9923	0,9852	0,9965	0,9881	0,9962
n-Butylacetat	0,9881	0,9992	0,9893	0,9969	0,9993	0,9836
Ethylbutyrat	0,9930	0,9987	0,9893	0,9976	0,9986	0,9920

kursiv: Methode für quantitative Bestimmung dieser Substanzen aufgrund zu schlechter Güte der Regressionsfunktion (Bestimmtheitsmaß für mindestens eine Faser <0,96) nicht geeignet, ²: Anwendung eines quadratischen Regressionsmodells

Anhang Tabelle 30: Kalibrierbereich und Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD und LOQ) für quantitative VOC-Bestimmung mit *in-situ*-SPME-GC-MS im HS von Zellkulturen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Kalibrierbereich /	LOD /		LOQ /
	µg-Zellkulturflasche ⁻¹	µg-Zellkulturflasche ⁻¹		µg-Zellkulturflasche ⁻¹
n-Pentan	0,023 - 0,589	0,0002		0,0007
n-Hexan	0,018 - 0,454	0,0007		0,0023
n-Heptan	0,042 - 0,911	0,0029		0,0097
n-Oktan	0,22 - 4,82	0,0014		0,0047
n-Nonan	0,001 - 0,021	0,0003		0,0010
n-Dekan	0,10 - 2,27	0,0068		0,0227
n-Dodekan	0,12 - 2,64	-		-
n-Tridekan	0,045 - 0,973	-		-
n-Tetradekan	0,14 - 3,04	-		-
2-Methylbutan	0,12 - 2,96	0,0054		0,0180
2-Methylpentan	0,023 - 0,578	0,0010		0,0033
3-Methylpentan	0,004 - 0,099	0,0008		0,0027
2-Methylhexan	0,009 - 0,192	0,0001		0,0003
3-Methylhexan	0,009 - 0,190	0,0005		0,0017
3-Methylheptan	0,008 - 0,181	0,0003		0,0010

Anhang Tabelle 30 (Fortsetzung): Kalibrierbereich und Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD und LOQ) für quantitative VOC-Bestimmung mit *in-situ*-SPME-GC-MS im HS von Zellkulturen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.2

Substanz	Kalibrierbereich / µg-Zellkulturflasche ⁻¹	LOD / µg-Zellkulturflasche ⁻¹	LOQ / µg-Zellkulturflasche ⁻¹
3-Methylnonan	0,009 - 0,193	0,0008	0,0027
3-Methylundekan	0,005 - 0,100	-	-
Cyclohexan	0,004 - 0,110	0,0008	0,0027
Methylcyclopentan	0,014 - 0,364	0,0004	0,0013
2-Methyl-1-penten	0,003 - 0,066	0,0006	0,0020
2,4-Dimethyl-1-hepten	0,002 - 0,049	0,0015	0,0050
Benzen	0,002 - 0,053	0,0007	0,0023
Ethylbenzen	0,002 - 0,054	0,0001	0,0003
o-Xylen	0,001 - 0,022	0,0003	0,0010
m/p-Xylen	0,002 - 0,052	0,0003	0,0010
Styren	0,043 - 0,938	0,0006	0,0020
Cumen	0,001 - 0,023	0,0001	0,0003
n-Propylbenzen	0,003 - 0,056	0,0004	0,0013
1-Ethyl-2-methylbenzen	0,002 - 0,052	0,0004	0,0013
1-Ethyl-3-methylbenzen	0,004 - 0,097	0,0003	0,0010
1-Ethyl-4-methylbenzen	0,002 - 0,050	0,0004	0,0013
1,2,3-Trimethylbenzen	0,004 - 0,086	-	-
1,2,4-Trimethylbenzen	0,008 - 0,178	-	-
Mesitylen	0,002 - 0,053	0,0003	0,0010
Phenol	0,1 - 27,0	-	-
Acetophenon	0,11 - 2,33	0,0115	0,0383
Pyrol	0,020 - 0,440	0,0049	0,0163
Propanal	0,089 - 1,943	0,0028	0,0093
n-Butanal	0,004 - 0,093	0,0014	0,0047
n-Pentanal	0,009 - 0,189	0,0043	0,0143
n-Hexanal	0,009 - 0,194	0,0056	0,0187
n-Heptanal	0,009 - 0,200	0,0030	0,0100
n-Oktanal	0,010 - 0,221	0,0101	0,0337
n-Nonanal	0,041 - 0,902	-	-
n-Dekanal	0,05 - 1,05	-	-
3-Methylbutanal	0,044 - 0,954	0,0063	0,0210
2-Methyl-2-propenal	0,002 - 0,049	0,0010	0,0033
2-Methyl-2-butenal	0,004 - 0,096	0,0020	0,0067
Ethanol	4 - 1013	0,0303	0,1010
1-Propanol	2,2 - 48,0	0,0973	0,3243
2-Propanol	2,2 - 47,7	0,0833	0,2777
1-Butanol	0,23 - 4,98	0,0848	0,2827
2-Methyl-2-propanol	4,0 - 87,7	0,0083	0,0277
2-Ethyl-1-hexanol	0,25 - 5,47	0,0818	0,2727
Cyclohexanol	0,5 - 10,4	0,1090	0,3633
Aceton	1,3 - 28,7	0,0341	0,1137
2-Butanon	0,44 - 9,60	0,0070	0,0233
2-Pentanon	0,004 - 0,095	0,0014	0,0047
3-Pentanon	0,009 - 0,194	0,0009	0,0030
2-Hexanon	0,009 - 0,189	0,0017	0,0057
3-Hexanon	0,004 - 0,095	0,0004	0,0013
2-Oktanon	0,009 - 0,199	0,0068	0,227
Cyclohexanon	0,13 - 2,90	0,0153	0,0510
Essigsäure	60 - 1234	7,8	26,0
Ethylacetat	0,021 - 0,467	0,0034	0,0113
n-Butylacetat	0,004 - 0,095	0,0018	0,0060
Ethylbutyrat	0,004 - 0,095	0,0019	0,0063

Quantitative Untersuchung des VOC-Profiles in Zellkulturen (Ergänzung zu Kapitel 3.3.2 und 4.1.2)

Für die Zelllinie A549 wurde die letzte Passage mit $5 \cdot 10^6$ Zellen und für die Zelllinien Lu7466 und Lu7387 wurde die letzte Passage mit $3 \cdot 10^6$ Zellen durchgeführt. Zeitgleich erfolgte die Vorbereitung analoger Proben mit zellfreien Nährmedien; diese Kulturflaschen wurden in einem separaten Brutschrank inkubiert. Bei der letzten Passage erfolgte ein Austausch der Filterkappen durch die speziellen Septumkappen. Eine Stunde vor Beginn der Probenahme wurden die Kulturflaschen durch Drehen der Septumkappen gasdicht verschlossen.

Die Beprobung der drei verschiedenen Zellkulturen und der korrespondierenden Nährmedien wurde an drei separaten Tagen binnen zwei Wochen durchgeführt. Die *in-situ*-SPME erfolgte manuell mit konditionierten Car/PDMS-Fasern (75 μ m). Es wurden die Fasern 2-6 und Faser 8 verwendet, die kalibriert worden waren. Dabei erfolgte die SPME durch direktes Einbringen der Faser durch den Septumdeckel (vgl. Abbildung 28, Seite 43) in den HS der Zellkultur. Eine Stabilisierung wurde durch ein Teflonwerkstück (vgl. Abbildung 29, Seite 43) erreicht. Die Extraktion erfolgte im Brutschrank bei 37 °C für 15 min. Es wurden sechs Proben (dreimal Zellen, dreimal Nährmedium) parallel extrahiert, so dass sechs Fasern des gleichen Typs und der gleichen Charge parallel im Einsatz waren.

Anschließend wurden die SPME-Fasern in Glasröhrchen mit in den Deckel eingelegtem Silikon/PTFE-Septum auf Trockeneis zur BAM Adlershof transportiert (vgl. Abbildung 30, Seite 43) und binnen 6 h im Injektor des GC-MS-Systems thermodesorbiert. Die Desorption fand bei 280 °C für 5 min statt, wobei das Splitventil die ersten 3 min geschlossen war. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Dabei wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Die Ermittlung der Signalfächen wurde im EIC für substanzspezifische Fragmente durchgeführt (Anhang Tabelle 23, Seite A-24).

Die Berechnung der VOC-Gehalte in den Zellkulturflaschen mit Zellen oder Nährmedium bestimmt mit der *in-situ*-SPME in der Einheit $\mu\text{g} \cdot \text{Zellkulturflasche}^{-1}$ erfolgte durch Anwendung der faser- und substanzspezifischen Regressionsfunktionen auf die ermittelten Signalfächen aus dem HS-SPME-GC-MS-Chromatogramm der Probe. Gehalte unter der Nachweisgrenze wurden als nicht nachweisbar in der Auswertung berücksichtigt, während für Gehalte über der Nachweis- aber unter der Bestimmungsgrenze der Einbezug des errechneten Zahlenwertes stattfand.

Falls für alle Analysen einer Drei- bzw. Sechsfachbestimmung (Nährmedium für die Zelllinien Lu7387 und Lu7466) die Gehalte für eine Substanz größer als die Nachweisgrenze waren, erfolgte die Angabe des Ergebnisses in der Form des Mittelwerts \bar{x} nach Formel (3) und der abgeschätzten Standardunsicherheit des Mittelwertes $u_{\bar{x}}$ nach Formel (5), bei der andere Unsicherheitsbeiträge, wie z. B. die Unsicherheit in der Kalibrierung, vernachlässigt wurden.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i \quad (3)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (4)$$

$$u_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{1}{n * (n-1)} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (5)$$

\bar{x} :	Mittelwert der Messwertreihe
n :	Anzahl der Messwerte
x_i :	einzelner Messwert
s :	Standardabweichung
$u_{\bar{x}}$:	Standardunsicherheit des Mittelwerts

Falls einzelne Werte nicht nachweisbar waren, erfolgte eine Konsolidierung in Anlehnung an das von Bremser [178] beschriebene Verfahren, indem zunächst Stellvertreterwerte für die weiteren Berechnungen eingesetzt wurden. Dafür erfolgte die Annahme einer Rechteckverteilung und die Einführung eines Wertes in Höhe der halben Nachweisgrenze als Ersatzwert nach Formel (6) (Seite A-39). Anschließend wurde die Standardunsicherheit für diesen einzelnen Stellvertreterwert nach Formel (7) abgeschätzt, so dass durch Einführung eines Faktors der Stellvertreterwert sowohl mit Null als auch mit der Nachweisgrenze kompatibel war; die Standardunsicherheit dieses Einzelwertes blieb im Weiteren konstant. Für die Einzelwerte mit Gehalten oberhalb der Nachweisgrenze erfolgte die Abschätzung der Standardunsicherheit in Abhängigkeit des Lageparameters A, der hier den Mittelwert ersetzt, nach Formel (8); dabei dient der Faktor 2 der Berücksichtigung eines angenäherten 95 %-Konfidenzintervalls. Die Bestimmung des Lageparameters A erfolgte iterativ, indem die Summe der Quadrate der Standardunsicherheit der Einzelwerte minimal wurde (Formel (9)). Anschließend erfolgte noch die Abschätzung der Standardunsicherheit des Lageparameters u_A nach Formel (10).

Für die einfaktorielle ANOVA mit dem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ wurden Einzelwerte unterhalb der Nachweisgrenze durch Null ersetzt.

für $x_i < LOD$:

$$x_i = \frac{LOD}{2} \quad (6)$$

$$u_i = \sqrt{3} \frac{LOD}{2} \quad (7)$$

für $x_i > LOD$:

$$u_i = \frac{|x_i - A|}{2} \quad (8)$$

$$\sum_{i=1}^n u_i^2 \rightarrow \min \quad (9)$$

$$u_A = \sqrt{\frac{1}{n * (n - 1)} * \sum_{i=1}^n u_i^2} \quad (10)$$

x_i : einzelner Messwert; für $x_i < LOD$ wurde ein Wert in Höhe des halben LOD nach Anhang Tabelle 30 (Seite A-36) eingesetzt

LOD : Nachweisgrenze

$\sqrt{3}$ in (7): Faktor, damit die Unsicherheit für $x_i < LOD$ sowohl 0, als auch den LOD einschließt

A: Lageparameter

2 in (8): Berücksichtigung des angenäherten 95 %-Konfidenzintervalls

u_i : Standardunsicherheit des Messwerts

u_A : Standardunsicherheit des Lageparameters

n: Anzahl der Messwerte

Probenahme für die qualitative Untersuchung des VOC-Profiles von Zellkulturen (Ergänzung zu Kapitel 3.3.3)

Die Zellanzucht und Vorbereitungen der Zellkulturen fanden parallel und in gleicher Weise statt, wie die für die quantitativen Untersuchungen mit *in-situ*-SPME-GC-MS. Je Zelllinie bzw. korrespondierendem zellfreien Nährmedium wurden drei zusätzlich Kulturflaschen vorbereitet. Die Beprobung der Gasphase, die Applikation von Zellkulturluft auf Probenahmeröhrchen mit Adsorbervlies und die

Entnahme von Kulturflüssigkeit erfolgten in diese Reihenfolge an den gleichen Ansätzen. Im Weiteren sind für jede Teilprobe die Probenahme und die Analyse beschrieben.

Für die Teilprobe Gas wurden ausgeheizte 20 mL-SPME-Vials für 30 s mit synthetischer Luft gespült und sofort mit Bördelkappen mit Silikon/PTFE-Septen verschlossen. Vor Ort bei der EPO GmbH erfolgte mittels gasdichter 25 mL-Glasspritze die partielle Evakuierung des Vials durch Aufziehen von 15 mL Luft. Anschließend wurden sofort 15 mL Luft aus dem Luftraum der Zellkulturflasche in die Spritze aufgezogen und in das vorbereitete Vial gegeben (Abbildung 36, Seite 51). Die Probenahme erfolgte dreimal für jede Zellkultur und das jeweilige Nährmedium, wobei jeweils ein neues Vial und eine neue Zellkulturflasche zum Einsatz kamen. Die befüllten Vials wurden zur BAM transportiert und die Proben binnen 12 h mittels automatisierter SPME mit konditionierter Car/PDMS-Faser (75 μ m) analysiert. Die Inkubation der Vials erfolgte für 5 min bei 37 °C und die Extraktion fand bei 37 °C für 60 min statt.

Die Applikation von Zellkulturluft in Probenahmeröhrchen mit Adsorbervlies fand direkt im Anschluss an die Probenahme der Teilprobe Gas mit derselben Zellkulturflasche statt. Dafür wurde eine gasdichte 100 mL-Glasspritze mit einer 115 mm-Kanüle ausgerüstet. Mit dieser Spritze erfolgte das Einstechen durch die Septumkappe in die Zellkulturflasche. Nun wurden 100 mL Luft aus dem Luftraum der Zellkulturflasche in die Spritze aufgezogen. Anschließend erfolgten das Herausziehen der Kanüle aus der Zellkulturflasche und das Einstechen in ein Probenahmeröhrchen (Abbildung 37, Seite 51). Das Probenahmeröhrchen war mit Polypropylen-Vliesen mit asota[®] olefin-Ausrüstung bestückt. Während der Applikation der Zellkulturluft waren beide Verschlüsse des Probenahmeröhrchens geöffnet. Das Gas wurde langsam aus der Spritze heraus gedrückt. Dieses Vorgehen erfolgte insgesamt dreimal, so dass je Zellkulturflasche und Probenahmeröhrchen 300 mL Gasraum appliziert wurden. Anschließend erfolgte das Verschließen der Probenahmeröhrchen mit Lochkappen und Silikon-Septen (die Ergebnisse des Lagerversuches zu standarddotierten Probenahmeröhrchen mit Silikon-Septen – vgl. Kapitel 3.2.2 – lagen noch nicht vor). Die befüllten Probenahmeröhrchen wurden zur BAM transportiert, zwischenzeitlich bei 6 °C gelagert und binnen 36 h mittels manueller SPME mit konditionierter Car/PDMS-Faser (75 μ m) untersucht. Es kam dieselbe Faser zum Einsatz die auch für die Analyse der Teilprobe Gas eingesetzt wurde. Die Extraktion fand bei 37 °C im Trockenschrank für 60 min statt.

Die Teilprobe Kulturflüssigkeit wurde aus derselben Zellkulturflasche wie die Gasproben entnommen. Dafür erfolgte eine Sterilfiltration der Kulturflüssigkeit aus den Flaschen mit Zellen und mit zellfreiem Nährmedium. 5,0 mL Kulturflüssigkeit wurden in ein ausgeheiztes, für 30 s mit synthetischer Luft gespültes 20 mL-Feingewindeial pipettiert und mit einer Schraubkappe mit Silikon/PTFE-Septum (1,5 mm) verschlossen. Es folgte der Probentransport zur BAM und die Lagerung bei 6 °C bis zum Analysenbeginn. Die Proben in den befüllten Vials wurden binnen 36 h mittels automatisierter SPME mit konditionierter Car/PDMS-Faser (75 μ m) analysiert, wobei die Inkubation der Vials für 5 min bei 37 °C und die Extraktion bei 37 °C für 15 min erfolgte.

Die weitere Aufarbeitung der beladenen SPME-Fasern war für alle Probentypen analog dem Vorgehen bei der *in-situ*-SPME. Die Desorption fand bei 280 °C für 5 min statt, wobei das Splitventil die ersten 3 min geschlossen war. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Dabei wurden nur Scan-Daten aufgenommen. Die Ermittlung der Signalflächen wurde im EIC für substanzspezifische Fragmente durchgeführt (Anhang Tabelle 23, Seite A-24). Für alle Probenahmeverfahren und Zelllinien bzw. korrespondierende Nährmedien wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für den Vergleich der Probenahmestrategien wurden die Signalflächen aus den Chromatogrammen von Zellkulturen mit denen des zugehörigen Kulturmediums durch einfaktorielle ANOVA (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) verglichen.

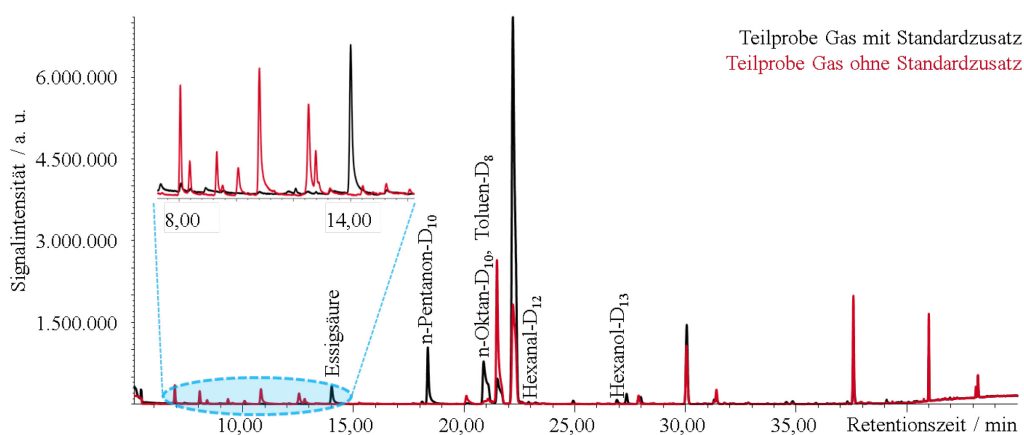
Einfluss interne Standardzugabe auf VOC-Analyse der Teilprobe Gas (Ergänzung zu Kapitel 3.3.3)

Es folgte die Analyse von vier weiteren Gas-Teilproben von A549-Zellkulturen, wobei zu zwei Teilproben 10 µL methanolische Lösung eines internen Standards (Anhang Tabelle 31, Seite A-41) dotiert wurden. Anschließend erfolgte eine HS-SPME-GC-MS-Analytik. Die Parameter entsprachen denen bei der Untersuchung der Teilprobe Gas für den Vergleich der Probenahmeverfahren.

Wie in Anhang Abbildung 11 (Seite A-41) zu erkennen, sind alle fünf Substanzen des ISTD identifizierbar. Bei Betrachtung eines vergrößerten Ausschnittes wird jedoch ersichtlich, dass durch den Zusatz der methanolischen Lösung eine deutliche Erniedrigung der Signalintensitäten der aus der Probe stammenden VOC folgte. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um einen Matrixeffekt des Lösungsmittels Methanol, welcher als zusätzliche Phase die Gleichgewichtseinstellung mit der Faser beeinflusst. Außerdem erfolgte durch die ISTD-Zugabe ein Essigsäureeintrag (14 min).

Anhang Tabelle 31: Konzentration in ng·µL⁻¹ von fünf deuterierten Substanzen in einem methanolischen Standardgemisch zur Einbringung in die Teilprobe Gas aus Lungenadenokarzinomzellkulturen; Ergänzung zu Kapitel 3.3.3

Substanz	Konzentration
3-Pentanon-D ₁₀	40
n-Oktan-D ₁₈	1720
Toluen-D ₈	20
n-Hexanal-D ₁₂	50
1-Hexanol-D ₁₃	250



Anhang Abbildung 11: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Gas-Teilproben aus A549-Zellkulturen mit und ohne Zusatz von methanolischer Standardlösung mit deuterierten VOC; Ergänzung zu Kapitel 3.3.3

A.5 Ergänzungen zur Analyse und Auswertung von Realproben

Eine komplette Zusammenfassung zu Equipment, Probenahme und SPME-GC-MS-Analyse von Atemluftproben von Studienteilnehmern und zur Auswertung der Chromatogramme ist in Anhang A.6 gegeben. In diesem Kapitel sind Durchführungen und Ergebnisse von Vorbereitungs- und Optimierungsversuchen sowie von Experimenten zur Ermittlung von Einflussfaktoren dargestellt.

Experimentelle Bestimmung der Anzahl der Atemzüge für die Probenahme (Ergänzung zu Kapitel 3.4.1)

Je Untersuchungstag wurden fünf adsorbervliesgefüllte Probenahmeröhrchen verschlossen mit Schraubkappen mit Apertur und Silikon-Septen mit je einem forcierten exhalativen Atemzug beatmet und die Beatmungsseite markiert. Die fünf Probenahmen folgten dabei zeitnah aufeinander, so dass nur wenige ruhige Atemzüge dazwischen lagen, in denen das soeben beatmete Röhrchen verschlossen und das nächste geöffnet wurde. Die gesamte Probenahme der fünf Proben war binnen 3 min abgeschlossen.

Die SPME erfolgte manuell mit einer Car/PDMS-Faser (75 μm) für 1 h bei Raumtemperatur auf der Beatmungsseite. Die Desorption der beladenen SPME-Faser fand bei 280 °C für 5 min statt, wobei das Splitventil die ersten 3 min geschlossen war. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Die MS-Detektion wurde im Scan-Modus für m/z 35-300 u durchgeführt. Die Identifizierung des als Leitsubstanz ausgewählten Isopren erfolgte über Retentionszeit- und Massenspektrenvergleich mit der authentischen Standardsubstanz. Die Signalfäche wurde im EIC für das Fragment mit m/z 69 u durchgeführt. Die Probenahme wurde je einmal an zwei aufeinander folgenden Tagen mit einem gesunden Probanden durchgeführt (Doppelbestimmung). Für die Auswertung wurde die mittlere Signalfäche aus den Chromatogrammen der zuerst beatmeten Probenahmeröhrchen einer Wiederfindung von 100 % gleichgesetzt und die nachfolgenden Atemproben darauf bezogen (Abbildung 38, Seite 53). Für das zuerst beatmete Röhrchen konnte die höchste Signalintensität für Isopren beobachtet werden während bei weiteren Atemzügen eine niedrigere Wiederfindung festzustellen war. Bereits beim zweiten Atemzug wurden im Mittel nur noch 75 % des Ausgangswertes detektiert. Es scheint also durch das Atemmanöver zu einer Abreicherung der VOC in der Ausatemluft gekommen zu sein.

Ein systematischer Fehler dieses Versuches besteht in dem Einsatz der Silikon-Septen. Zum Zeitpunkt dieser Versuchsdurchführung lagen die Ergebnisse des ersten Lagerversuches der standarddotierten Probenahmeröhrchen (vgl. Kapitel 3.2.2) noch nicht vor. Bei dem Lagerversuch war festgestellt worden, dass bei Verwendung der Silikon-Septen für Isopren eine zügige Intensitätsabnahme auf 20 % des Ausgangswertes binnen 24 h stattfand (vgl. Abbildung 23, Seite 37). Mit diesem Wert kann die zu erwartende Intensitätsabnahme binnen der ersten Stunde abgeschätzt werden. Dafür wird vereinfacht eine zeitabhängige, exponentielle Konzentrationsabnahme des Isoprens in dem Probenahmeröhrchen angenommen. In diesem Fall würde die Wiederfindung in der ersten Stunde von 100 % auf 93,5 % sinken. Bei dem hier beschriebenen Versuch zur Bestimmung der Anzahl der Atemzüge wurden die Atemluftproben in den Probenahmeröhrchen zwar direkt nach der Probenahme analysiert, allerdings dauerte die Extraktion für jede Probe 60 min. Während dieses Zeitraumes war aufgrund der Verwendung der Silikon-Septen mit einem Verlust von Isopren zu rechnen. Folglich waren in der zweiten Probe nur noch ca. 93,5 % der Ausgangsintensität durch Verluste über die Septen zu erwarten. Allerdings war dieser abgeschätzte systematische Fehler geringer als die beobachtete Signalabnahme von 100 % auf 75 % vom ersten zum zweiten Atemzug. Entsprechend konnte diese Abnahme nicht ausschließlich auf den Isoprenverlust durch das ungeeignete Material zurückgeführt werden. Demzufolge lag zusätzlich ein Einfluss der wiederholten Atemluftprobenahme vor.

Experimentelle Bestimmung der Wartezeit zwischen zwei Probenahmen (Ergänzung zu Kapitel 3.4.1)

Für jede zu untersuchende Wartezeit wurden vier adsorbervliesgefüllte Probenahmeröhrchen verschlossen mit Schraubkappen mit Apertur und Silikon-Septen mit je einem forcierten exhalativen Atemzug beatmet. Die Beatmungsseite wurde markiert. Zwischen zwei Atemluftproben wurde eine Wartezeit von 5, 10 oder 15 min eingehalten, in der auf ruhige Atmung geachtet wurde (Anhang Tabelle 32).

Anhang Tabelle 32: Probenahmezeitpunkt für die Beatmung von Probenahmeröhrchen mit einem Atemzug mit verschiedenen Wartezeiten zwischen je zwei Proben; Ergänzung zu Kapitel 3.4.1

Röhrchen Nr.	Messtag 1 (Wartezeit 15 min)	Messtag 2 (Wartezeit 10 min)	Messtag 3 (Wartezeit 5 min)
	min	min	min
1	0	0	0
2	15	10	5
3	30	20	10
4	45	30	15

Die SPME in den beatmeten Probenahmeröhrchen erfolgte manuell mit einer Car/PDMS-Faser (75 μm) für 1 h bei Raumtemperatur auf der Beatmungsseite. Die Desorption der beladenen SPME-

Faser fand bei 280 °C für 5 min statt, wobei das Splitventil die ersten 3 min geschlossen war. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Die MS-Detektion wurde im Scan-Modus für m/z 35-300 u durchgeführt. Die Identifizierung des Isoprensignals erfolgte über Retentionszeit- und Massenspektrenvergleich mit der authentischen Standardsubstanz. Die Bestimmung der Signalfläche wurde im EIC für das Fragment mit m/z 69 u durchgeführt. Die Versuchsdurchführung wurde für jede Wartezeit einmal vorgenommen; die insgesamt drei Versuchsdurchführungen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 (Seite 53) veranschaulicht.

Überprüfung der Wartezeit von 10 min (Ergänzung zu Kapitel 3.4.1)

Im Selbstversuch wurden fünf Atemproben im Abstand von 10 min im Büro bei geöffnetem Fenster genommen. Die Probenahme erfolgte auf nüchternen Magen mit Gassammelrohren, wobei das Atemmanöver entsprechend dem Probenahmeprotokoll durchgeführt wurde.

Diese Atemluftproben wurden mit HS-SPME-GC-MS untersucht. Zusätzlich erfolgte die Vorbereitung und Analyse von drei Qualitätskontrollstandardproben mit den Standardlösungen mit den Konzentrationsniveaus Nr. 2, 6 und 8 (Anhang Tabelle 16, Seite A-11), um die Atemproben quantitativ auswerten zu können. Details zur Vorbereitung der Qualitätskontrollstandardproben, HS-SPME-GC-MS-Analytik, Datenauswertung und Quantifizierung sind in Anhang A.6 (Seite A-72) dargelegt. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. Die Auswertung erfolgte quantitativ. Es wurden nur auswertbare Signale im Arbeitsbereich der Kalibrierung betrachtet. Die Ergebnisse sind in Anhang Tabelle 33 zusammengefasst. Von den 24 Zielsubstanzen und drei Matrix-VOC konnten 16 ausgewertet werden.

Anhang Tabelle 33: Ergebnis der wiederholten Probenahme von Atemluft mit dem Gassammelrohr (n=5) gefolgt von quantitativer HS-SPME-GC-MS-Analyse; Ergänzung zu Kapitel 3.4.1

Substanz	mittlerer Gehalt / ng·L ⁻¹	Standardabweichung / ng·L ⁻¹	relative Standardabweichung / %
n-Pentan	2,55	0,24	9
n-Hexan	2,44	0,78	32
n-Heptan	0,343	0,209	61
n-Oktan	n. d.	-	-
n-Nonan	n. d.	-	-
n-Dodekan	n. d.	-	-
2-Methylpentan	0,945	0,057	6
3-Methylpentan	0,539	0,039	7
Cyclohexan	22 [#]	2	9
Methylcyclopentan	0,481	0,077	16
Benzen	0,372*	0,036	10
Ethylbenzen	0,074*	0,009	12
n-Propylbenzen	0,009*	0,005	56
Propanal	1,20*	0,64	53
n-Butanal	n. a.	-	-
n-Pentanal	n. d.	-	-
n-Hexanal	n. d.	-	-
n-Heptanal	n. d.	-	-
n-Oktanal	n. d.	-	-
n-Nonanal	n. d.	-	-
n-Dekanal	n. d.	-	-
1-Butanol	0,408*	0,070	17
2-Butanon	1,59*	0,13	8
2-Pentanon	2,58	0,09	3
Isopren	723	70	10
Aceton	8300	247	3
2-Propanol	n. d.	-	-

n. a.: nicht auswertbar, n. d.: nicht detektierbar, *: Gehalt unterhalb Bestimmungsgrenze; #: Gehalt über Arbeitsbereich der Kalibrierung

Screeninguntersuchungen von Atemluftproben von sechs Lungenkrebspatienten (Ergänzung zu Kapitel 3.4.2 und 4.2.1)

Die Probenahme von Atemluft von sechs Lungenkrebspatienten erfolgte nach Aufklärung und Einwilligung gemäß dem entwickelten Probenahmeprotokoll in den Kliniken (vgl. Kapitel 3.4.1 ab Seite 52 und BAM-1.2-ALA-01 ab Seite A-78). Die gefüllten Koffer wurden für die Analyse zur BAM transportiert.

Die SPME in den befüllten Gassammelrohren erfolgte manuell mit einer Car/PDMS-Faser (75 µm) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Desorption der beladenen SPME-Faser fand bei 280 °C für 5 min statt, wobei das Splitventil die ersten 3 min geschlossen war. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Die MS-Detektion wurde im Scan-Modus für m/z 35-300 durchgeführt. Die Identifizierung erfolgte entweder durch Vergleich der Retentionszeit und des Massenspektrums mit der authentischen Standardsubstanz oder durch Abgleich des Massenspektrums mit der NIST-Datenbank.

Eine Liste der detektierten Signale findet sich in Anhang Tabelle 34 (ab Seite A-45). Für Patient Nr. 1001 konnten trotz der Selbsterklärung als Nichtraucher hohe Signalintensitäten für raucher-spezifische Substanzen beobachtet werden. Eventuell war dieser Patient kurz vor der Probenahme Passivrauchen ausgesetzt oder die Angabe im Patientenerhebungsbogen war fehlerhaft.

Die im Anschluss an die Analytauswahl erstellte SIM-Methode ist in Anhang Tabelle 17 (Seite A-12) aufgeführt.

Eigenuntersuchungen zum Blindwert (Ergänzung zu Kapitel 3.4.3 und 4.2.4)

Die Eigenuntersuchungen wurden in zwei Varianten (A und B) durchgeführt. Die Proben wurden quantitativ mit HS-SPME-GC-MS untersucht. Details sind in Anhang A.6 (Seite A-72) dargelegt. Die Versuche wurden für drei gesunde Probanden als Doppelbestimmung an verschiedenen Tagen durchgeführt.

Variante A: Ein Proband hielt sich für 2 h im Arztraum in der BAM auf, wobei direkt nach dem Betreten, nach 30 min und nach 120 min Aufenthalt je eine Atemprobe mittels Gassammelrohr genommen wurde. Parallel zu jedem Probenahmezeitpunkt wurde eine Blindwertprobe genommen. Die Ergebnisse für 16 auswertbare Zielsubstanzen sind in Anhang Abbildung 12 dargestellt.

Variante B: Je zwei Probanden hielten sich zunächst für 1 h in einem nahegelegenen Park an der frischen Luft auf. Anschließend wurde je Proband eine Atemluftprobe an der frischen Luft mittels Gassammelrohr genommen. Daraufhin hielten sich die Probanden für 30 min im Arztraum in der BAM auf und es erfolgte eine zweite, analoge Probenahme im Arztraum. Die Probenahme erfolgte mit Gassammelrohren. Parallel zu jedem Probenahmezeitpunkt wurde eine Blindwertprobe genommen. Die Ergebnisse für 22 auswertbare Zielsubstanzen sind in Anhang Abbildung 13 dargestellt.

Überprüfung der 30 min Wartezeit nach dem Rauchen (Ergänzung zu Kapitel 3.4.3 und 4.2.5)

Im Selbstversuch wurde eine Atemprobe 10 min vor dem Rauchen eines Zigarillos (Dannemann Moods Sweet Filter dipped Cigarillos), eine direkt danach ($t=0$) und je eine weitere Probe 10, 30 und 120 min nach dem Rauchen genommen. Die Probenahme erfolgte mit Gassammelrohren und einem Atemmanöver entsprechend dem Probenahmeprotokoll (Kapitel 3.4.1). Die Probenahme erfolgte auf nüchternen Magen und das Rauchen erfolgte „auf Lunge“. Als Probenahmeort diente ein Büro bei geöffnetem Fenster. Die Proben wurden quantitativ mit HS-SPME-GC-MS analysiert. Details zur Vorbereitung der Qualitätskontrollstandardproben, HS-SPME-GC-MS-Analyse, Datenauswertung und Quantifizierung sind in Anhang A.6 (Seite A-72) dargelegt. Der Versuch wurde dreimal an verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei am ersten Versuchstag die Datenaufzeichnung für eine Wartezeit von 30 min fehlschlug. In Anhang Tabelle 35 (ab Seite A-49) sind die Gehalte der 24 Zielsubstanzen in Abhängigkeit des Probenahmezeitpunktes aufgeführt.

Anhang Tabelle 34: Liste der Signale in den HS-PME-GC-MS-Chromatogrammen aus den Screeninganalysen von Atemluftproben in Gassammelrohren von sechs Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 3.4.2 und 4.2.1

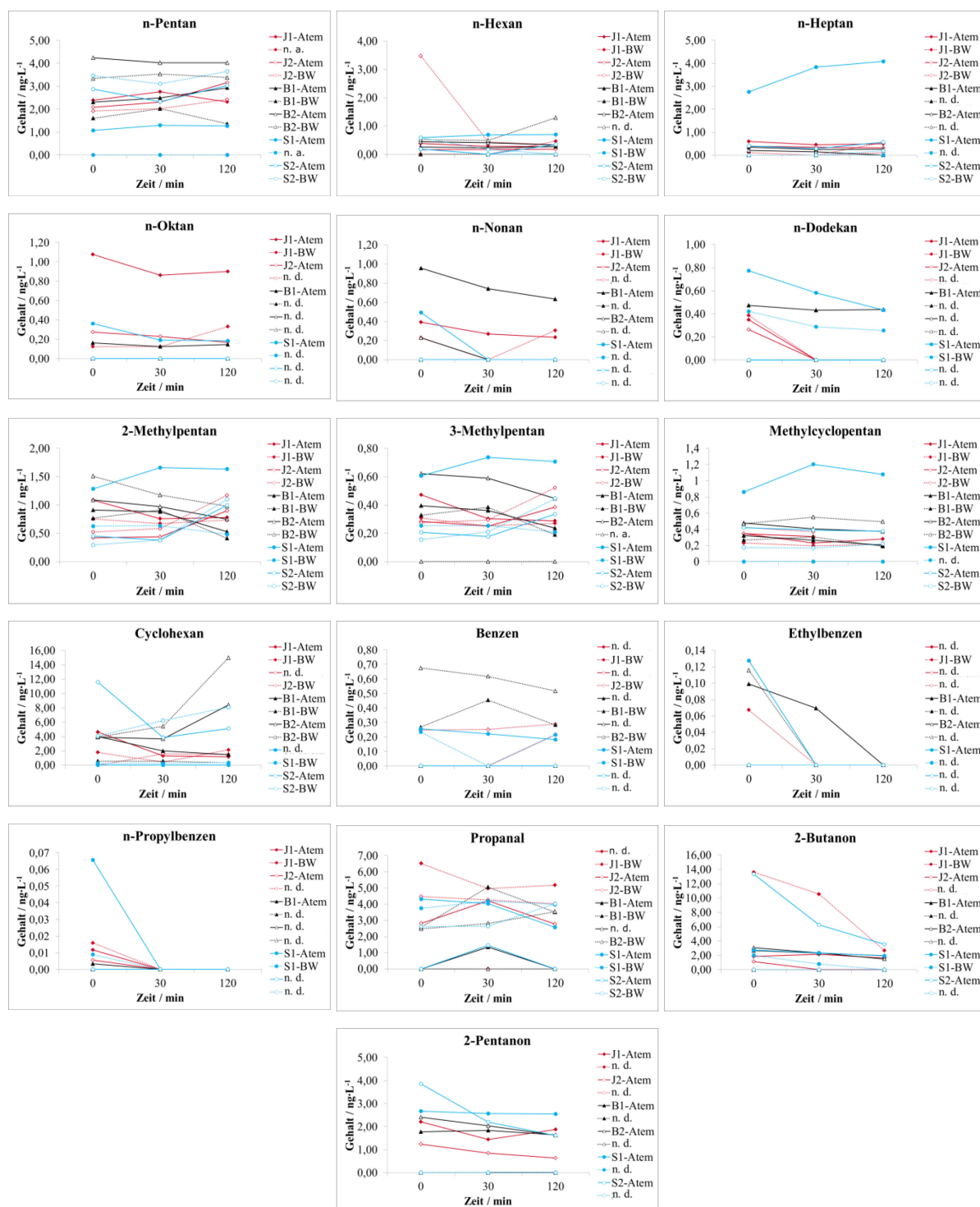
Substanz	Retentionszeit ¹ / min		Probenbezeichnung					
			Screen 1	Screen 2	Screen 3	Screen 4	Screen 5	Screen 6
			AC R	NSCLC NR	NSCLC R	PEC R	AC NR	AC NR*
2-Methylbutan	5,855	(j)	x	x	x	x	x	x
n-Pentan	6,489	(j)	x	x	x	x	x	x
Ethanol	6,575	(j)	x	x	x	x	x	x
Isopren	7,074	(j)	x	x	x	x	x	x
Propanal	7,469	(j)	x	x	x	x	x	
Aceton	7,624	(j)	x	x	x	x	x	x
2-Propanol	7,939	(j)	x	x	x	x	x	x
Acetonitril *	8,310		x			x		x
t-Butanol	8,994	(j)						x
2-Methyl-1-penten	10,006	(j)	x		x			x
n-Hexan	10,239	(j)					x	x
Dimethylselenid	10,376			x			x	
2-Methyl-2-propenal	10,488	(j)	x	x	x	x	x	x
1-Propanol	10,720	(j)	x	x	x	x	x	x
2-Methylfuran	11,241		x		x	x		x
2,3-Butadion	11,799		x	x	x	x	x	x
2-Butanon	12,119	(j)	x	x	x	x	x	x
n. i.	12,573		x		x	x	x	
C ₆ H ₈ *	12,865		x		x	x		x
C ₆ H ₈ *	13,170		x		x	x		x
Essigsäure	14,022	(j)	x	x	x	x	x	x
Benzen	14,524	(j)	x		x	x		x
C ₈ H ₁₈	14,804						x	x
n-Heptan	15,347	(j)	x	x	x	x	x	x
1-Butanol	16,035	(j)	x	x	x	x	x	x
Allylmethylsulfid	16,371			x		x	x	
2,5-Dimethylfuran *	16,511		x		x	x		x
2-Pentanon	16,864	(j)	x	x	x	x	x	X
Methylcyclohexan	17,058		x	x	x	x	x	x
1-(Methylthio)propan	17,189						x	x
n-Pentanal	17,241	(j)	x	x	x		x	
Ethylcyclopentan	17,559		x	x	x			
E/Z-1-(Methylthio)-1-propen	17,689						x	x
E/Z-1-(Methylthio)-1-propen	18,473					x	x	x
Pyrazin	19,058					x		x
3-Hydroxy-2-butanon	19,382		x		x	x	x	x
Dimethyldisulfid	19,411			x				
Pyridin	19,838					x		
C ₈ H ₁₈	20,046		x	x				x
n. i.	20,078					x		
Toluen**	20,288	(j)	x	x	x	x	x	X
Tetrachlorethylen	21,864			x				
n-Hexanal	22,726	(j)	x	x	x	x	x	x
Ethylcyclohexan	23,048		x	x		x	x	x
C ₁₂ H ₂₄	23,224		x	x				
Ethylbenzen	25,212	(j)	x	x	x	x	x	x
m-/p-Xylen	25,652	(j)	x	x	x	x	x	x
Furfural	25,627		x	x	x	x	x	x
n-Nonan	25,749	(j)	x	x	x		x	x
o-Xylen	26,967	(j)	x	x	x	x	x	x
Styren	27,060	(j)	x	x	x	x	x	x
n-Heptanal	27,533	(j)	x		x			
C ₁₀ H ₁₆	27,710							x

R: aktiver Raucher, NR: Nichtraucher, AC: Adenokarzinom, PEC: Plattenepithelkarzinom, NSCLC: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, n. i.: nicht identifizierbar, ¹: Angabe (j) bedeutet, dass Retentionszeit mit authentischer Substanz geprüft wurde, *: spezifische Rauchermarker (Acetonitril, 2,5-Dimethylfuran) nachgewiesen, **: Laborkontamination

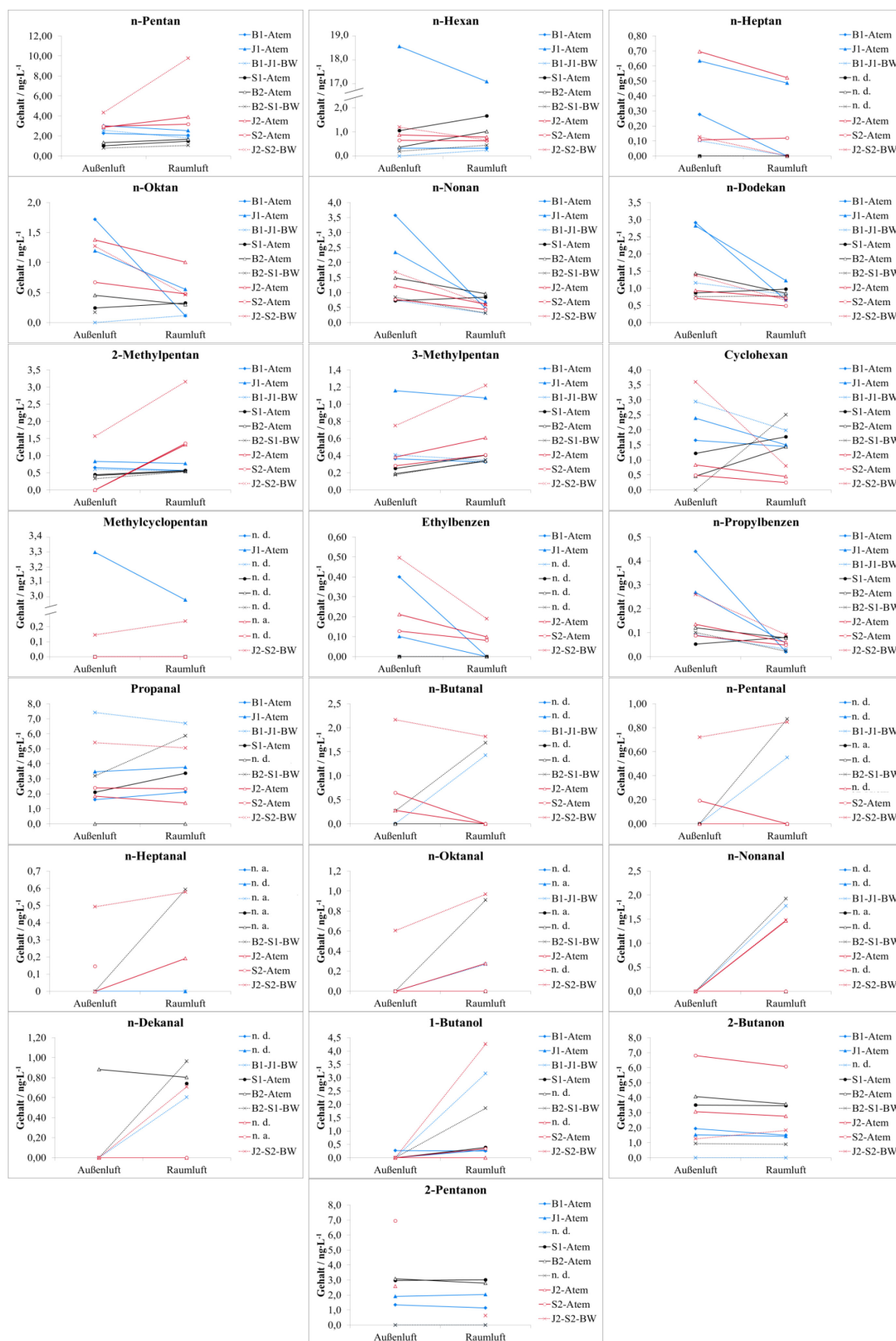
Anhang Tabelle 34 (Fortsetzung): Liste der Signale in den HS-PME-GC-MS-Chromatogrammen aus den Screeninganalysen von Atemluftproben in Gassammelrohren von sechs Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 3.4.2 und 4.2.1

Substanz	Retentionszeit ¹ /		Probenbezeichnung					
	min		Screen 1	Screen 2	Screen 3	Screen 4	Screen 5	Screen 6
			AC R	NSCLC NR	NSCLC R	PEC R	AC NR	AC NR*
n. i.	27,891		x			x		
C ₁₀ H ₁₆	28,199		x	x	x	x	x	x
Cyclohexanon	28,549	(j)	x	x	x	x	x	x
1,2,3-Trichloropropan	29,600		x	x	x	x		x
n-Propylbenzen	29,745	(j)	x	x	x	x		x
1-Ethyl-3-methylbenzen	30,057	(j)	x	x	x	x	x	x
Methoxyphenyloxim	30,067					x	x	x
1-Ethyl-4-methylbenzen	30,202	(j)	x	x	x	x		x
1,3-Dichlor-2-propanol	30,207		x	x	x	x		x
2,2,4,6,6-Pentamethylheptan	30,498		x	x	x	x	x	x
1-Ethyl-2-methylbenzen	31,085	(j)				x		
C ₉ H ₁₀	31,250		x	x	x	x	x	x
2,3-Dehydro-1,8-cineol	31,384						x	
γ-Butyrolacton	31,610	(j)	x	x	x		x	
1,2,4-Trimethylbenzen	31,854	(j)	x	x	x	x	x	x
C ₁₀ H ₁₆	31,910			x		x	x	
C ₈ H ₁₄ O	32,048						x	x
C ₁₂ H ₂₆	32,520		x	x	x	x		x
C ₁₀ H ₁₆	33,047		x	x	x		x	x
C ₁₀ H ₁₄	33,282		x	x	x	x	x	X
1,2,3-Trimethylbenzen	33,616	(j)	x	x	x	x		x
Eucalyptol	33,800		x	x	x		x	x
2-Ethyl-1-hexanol	34,430	(j)	x	x	x	x	x	x
C ₁₀ H ₁₄	34,820		x	x	x	x		
C ₁₀ H ₁₄	35,127		x	x	x	x		x
Phenol	35,462	(j)	x	x	x	x	x	x
n-Undekan	35,896	(j)	x	x	x			x
C ₁₀ H ₁₄	36,221		x	x	x	x		x
Acetophenon	37,279	(j)	x	x	x	x	x	x
n-Nonanal	37,616	(j)	x	x	x			
α-Cymylalcohol	37,809		x	x	x	x	x	x
C ₁₀ H ₁₄	37,883		x	x		x		x
Dihydroxytoluen	38,266				x			
C ₁₀ H ₁₂	38,832		x	x		x	x	
n-Dodekan	38,928	(j)		x	x	x	x	x
C ₁₀ H ₁₈ O	39,365				x			
C ₁₀ H ₁₆ O	39,439		x		x		x	
C ₁₀ H ₁₈ O	39,676							x
n-Dekanal	39,967	(j)	x		x	x		
C ₁₁ H ₂₀ O ₂ (Esterstruktur)	40,057		x	x	x	x	x	x
n. i.	40,867			x	x			
n. i.	40,931				x			
C ₁₂ H ₂₂ O ₂	41,272				x			x
C ₁₆ H ₃₄ (verzweigtes Alkan)	41,388		x	x	x		x	x
5-(Hydroxymethyl)-2-furfural	41,697				x			
C ₁₅ H ₂₄	42,211		x	x				x
C ₁₅ H ₂₄	42,427		x	x				x
C ₁₅ H ₂₄	42,655		x	x	x		x	x
Phthalat	42,790					x		
C ₁₅ H ₂₄	42,803		x	x				
C ₁₅ H ₂₄	43,208		x	x	x	x	x	x
C ₁₅ H ₂₄	43,282		x	x		x		x

R: aktiver Raucher, NR: Nichtraucher, AC: Adenokarzinom, PEC: Plattenepithelkarzinom, NSCLC: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, n. i.: nicht identifizierbar, ¹: Angabe (j) bedeutet, dass Retentionszeit mit authentischer Substanz geprüft wurde, *: spezifische Rauchermarker (Acetonitril, 2,5-Dimethylfuran) nachgewiesen, **: Laborkontamination



Anhang Abbildung 12: Eigenuntersuchungen zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf das VOC-Profil in der Atemluft (Durchführung A) für verschiedene Probanden (B, J, S); Ergänzung zu Kapitel 4.2.4



Anhang Abbildung 13: Eigenuntersuchungen zum Einfluss der Umgebungsluft (BW) auf das VOC-Profil in der Atemluft (Durchführung B) für verschiedene Probanden (B, J, S); je eine Blindwertprobe steht im Zusammenhang mit zwei Atemluftproben verschiedener Probanden; Ergänzung zu Kapitel 4.2.4

Anhang Tabelle 35: VOC-Gehalte in der Atemluft in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ nach Rauchen eines Zigarillos zum Zeitpunkt t; Ergänzung zu Kapitel 3.4.3 und 4.2.5

Substanz	Durchgang	VOC-Gehalt zum Zeitpunkt				
		t-10 min	t	t+10 min	t+30 min	t+120 min
n-Pentan	1	4,4	17,5	7,4	*	3,5
	2	1,8	19,8	1,7	1,6	0,5
	3	15,3	23,0	12,8	12,7	13,8
n-Hexan	1	0,67	3,12	1,41	*	0,82
	2	0,40	3,46	0,84	0,53	0,47
	3	1,31	3,57	1,59	1,61	1,06
n-Heptan	1	0,52	3,34	1,26	*	0,81
	2	0,60	4,01	0,95	0,63	0,52
	3	0,57	3,59	1,08	0,81	0,68
n-Oktan	1	0,37	0,58	0,71	*	0,47
	2	0,51	0,46	0,58	0,44	0,36
	3	n. d.	0,80	0,61	0,59	1,27
n-Nonan	1	0,50	1,96	0,92	*	0,68
	2	0,66	1,40	0,37	0,27	0,31
	3	n. d.	2,17	1,11	1,85	2,85
n-Dodekan	1	0,45	1,74	1,10	*	0,81
	2	1,03	3,01	1,45	1,12	1,05
	3	n. d.	2,10	1,71	2,10	3,78
2-Methylpentan	1	2,25	2,81	2,32	*	1,80
	2	0,75	2,61	0,95	0,80	0,62
	3	1,44	2,91	1,57	1,12	1,38
3-Methylpentan	1	1,14	1,27	1,11	*	1,11
	2	0,36	1,05	0,39	0,33	0,41
	3	0,71	1,13	0,55	0,56	0,74
Cyclohexan	1	n. e.	n. e.	n. e.	*	n. e.
	2	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
	3	8,61	8,09	7,89	14,59	13,83
Methylcyclopentan	1	0,87	n. a.	1,38	*	0,79
	2	0,60	2,23	0,74	0,55	0,44
	3	0,66	n. a.	0,81	0,70	0,62
Benzen	1	0,7	28,6	7,6	*	1,7
	2	0,4	30,2	5,6	2,6	0,8
	3	0,9	20,6	6,6	4,3	1,7
Ethylbenzen	1	0,26	7,48	1,06	*	0,32
	2	0,25	4,88	1,09	0,41	0,24
	3	n. d.	4,89	1,94	0,70	0,20
n-Propylbenzen	1	0,060	1,283	0,217	*	0,082
	2	0,094	0,864	0,248	0,114	0,065
	3	n. d.	1,033	0,539	0,369	0,313
Propanal	1	n. d.	145,2	11,8	*	0,9
	2	1,7	121,2	6,5	n. d.	1,7
	3	n. d.	161,4	26,7	5,4	n. d.
n-Butanal	1	n. a.	n. a.	n. a.	*	n. a.
	2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

*: aufgrund eines Softwarefehlers erfolgte keine Aufzeichnung der Daten für die Atemluftprobe 30 min nach dem Rauchen in Durchgang 1, n. d.: nicht detektierbar, n. a.: nicht auswertbar (Koelution), n. e.: nicht erfassbar (detektierte Signalintensitäten konnten durch quadratische Regressionskurve nicht ausgewertet werden)

Anhang Tabelle 35 (Fortsetzung): VOC-Gehalte in der Atemluft in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ nach Rauchen eines Zigarillos zum Zeitpunkt t; Ergänzung zu Kapitel 3.4.3 und 4.2.5

Substanz	Durchgang	VOC-Gehalt zum Zeitpunkt				
		t-10 min	t	t+10 min	t+30 min	t+120 min
n-Pentanal	1	0,29	3,79	0,45	*	0,32
	2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
n-Hexanal	1	0,40	n. a.	n. a.	*	0,46
	2	0,25	n. a.	0,27	0,22	0,20
	3	n. d.	n. a.	n. d.	n. d.	n. d.
n-Heptanal	1	0,52	n. a.	n. a.	*	0,57
	2	0,35	n. a.	n. a.	n. a.	0,43
	3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
n-Oktanal	1	n. d.	1,12	0,61	*	n. d.
	2	n. d.	1,02	0,70	n. d.	n. d.
	3	n. d.	0,65	n. d.	n. d.	n. d.
n-Nonanal	1	n. d.	1,87	0,64	*	0,45
	2	0,43	1,35	0,71	0,51	0,44
	3	n. d.	1,48	n. d.	n. d.	n. d.
n-Dekanal	1	n. d.	n. a.	1,01	*	0,79
	2	n. d.	n. a.	0,81	n. d.	n. d.
	3	0,94	n. a.	2,75	n. d.	0,69
1-Butanol	1	0,44	6,34	0,84	*	0,55
	2	0,42	5,07	0,67	0,28	0,37
	3	n. d.	9,99	0,32	n. d.	2,03
2-Butanon	1	3,1	350,2	18,8	*	3,9
	2	2,8	400,0	16,4	4,0	1,8
	3	1,2	230,6	31,7	7,9	1,9
2-Pentanon	1	3,04	46,92	5,69	*	3,57
	2	3,83	41,30	4,66	2,78	3,22
	3	2,47	49,80	5,95	2,28	1,44

*: aufgrund eines Softwarefehlers erfolgte keine Aufzeichnung der Daten für die Atemluftprobe 30 min nach dem Rauchen in Durchgang 1, n. d.: nicht detektierbar, n. a.: nicht auswertbar (Koelution), n. e.: nicht erfassbar (detektierte Signalintensitäten konnten durch quadratische Regressionskurve nicht ausgewertet werden)

Auftragsanalyse mit HS-SPME-GC-CIMS durch GWT-TUD GmbH (Ergänzung zu Kapitel 3.4.4)

Insgesamt drei adsorbervliesgefüllte Probenahmeröhrchen verschlossen mit Schraubkappen mit Aperitur und Silikon/PTFE-Septen wurden im GC-CIMS-Labor der GWT-TUD GmbH (Dresden, Deutschland) mit HS-SPME-GC-CIMS untersucht: ein nichtbeatmetes Röhrchen, ein Röhrchen mit der Atemluft eines Patienten und eines mit dem Atem eines gesunden Probanden. Die Extraktion wurde mit einer DVB/Car/PDMS (50/30 μm)-Faser für 20 min bei 28 °C durchgeführt. Die Desorption der Faser erfolgte für 1 min bei 270 °C, wobei das Splitventil die ersten 12 s geschlossen war.

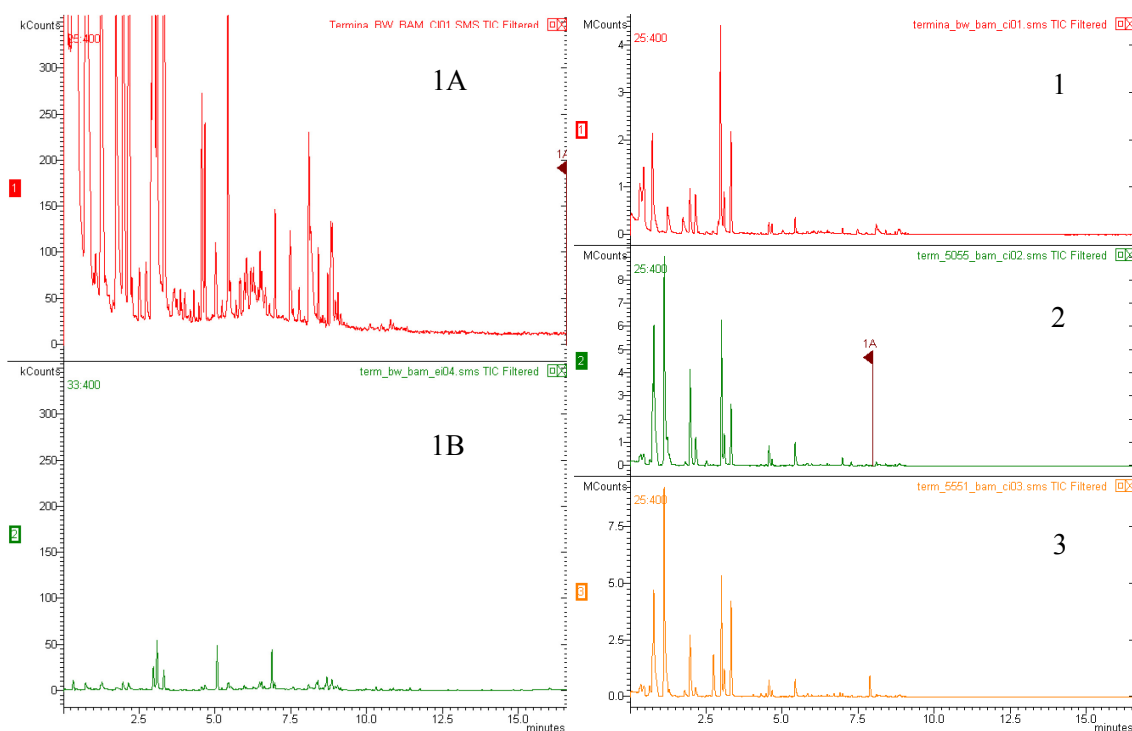
In einem GC des Typs 431 (Varian) wurde auf einer Rxi-624 Sil MS (10 m x 0,18 mm x 1,0 μm , Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland) mit Helium bei einem konstanten Druck von 9,3 psi mit folgendem Temperaturprogramm getrennt: 40 °C, 0,6 min, 15 °C $\cdot\text{min}^{-1}$, 280 °C, 5,9 min. Die Detektion erfolgte mit einem Ion Trap MS Typ 220 (Varian) mit interner CI mit Wasser (Patent No. US 7 960 689 B2).

Die Blindwertprobe wurde zum Vergleich ein zweites Mal extrahiert und mit EI detektiert. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit der Varian Workstation 6.9.3. Die Auswertung erfolgte durch Identifizierung der Signale unter Anwendung von Spektrendekonvolution und Abgleich mit in der Datenbank hinterlegten Massenspektren und Retentionszeiten; nur ein Teil der hinterlegten Standardsubstanzen war als authentische Substanz analysiert worden.

Die entsprechenden Chromatogramme sind in Anhang Abbildung 14 (Seite A-52) abgebildet. Eine Übersicht von Signalen, die entweder in der Atemluftprobe des Patienten oder des Gesunden gefunden wurde, ist in Anhang Tabelle 36 (Seite A-51) gegeben.

Anhang Tabelle 36: Liste von Substanzen, die bei Anwendung von HS-SPME-GC-CIMS-Analyse von Probenröhrchen entweder in der Atemluftprobe eines Lungenkrebskranken (k) oder eines Gesunden (g) detektiert wurden; Ergänzung zu Kapitel 3.4.4

Substanz	k	g	Substanz	k	g
1-(2-Ethoxypropoxy)-2-propanol		x	Benzylsalicylat		x
1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol		x	Benzylamin	x	
1,1-Dichlorethen		x	Butandial		x
1,1-Dichlorethan		x	Butylacrylat		x
1,1'-Oxybis-2-propanol	x		Chloroform	x	
1,2,3-Trichlorbenzen	x		cis-3-Deken-1-ol		x
1,2-Cyclohexandion	x		cis-Methyl-4-oxo-2-pentenoat	x	
1,2-Dibromethan		x	Dimethyl-2-methoxy-2-butendioat		x
1,2-Dichlorpropan		x	Dimethyl-2-hydroxy-2-methylsuccinat	x	
1,3,5-Trioxan		x	Dimethylglutarat	x	
1,4-Benzendiol		x	Dimethylmethoxysilanol	x	
1,8-Cineol (Eucalyptol)		x	Dimethylprolin		x
1-Methyl-2-methoxypyrimidin-4-on	x		Dimethylsulfat		x
1-Penten-3-on		x	Dimethyltrisulfid		x
1-Phenyl-2-butanon	x		Ethin		x
1-Tetradekanol		x	Ethylacetat	x	
1-Vinylpyrrolidinon	x		Ethylheptanoat	x	
2-(Methylthio)ethanol	x		Ethylloktanoat	x	
2,2-Dimethylpropanamid		x	FAME a-C7:0-5Me	x	
2,3-Heptandion		x	FAME a-C8:0-5Me		x
2,3-Oktandion	x		FAME C11:0		x
2,4-Dicyano-1-buten	x		FAME C3-2OH		x
2,4-Hexadienal	x		FAME C8:0	x	
2,6(E,E)-Oktadienal		x	FAME i-C4:0		x
2,6-Dekadienal	x		FAME i-C7:0-5Me	x	
2,6-Dimethylpyrazin		x	Glutarodinitril		x
2,6-Dimethylanisol		x	Hydroxyessigsäure	x	
2,3,4,5-Tetramethyl-1-imidazolinon	x		Maltol	x	
2-Butennitril		x	Methyl-2,4-dimethoxybutanoat	x	
2-Chlorphenol		x	Methyl-4-Aminobutyrat (GABA)	x	
2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolan		x	Methyl-2-(methylthio)-acetat	x	
2-Ethylbuttersäure	x		Methyl-2-methylactat	x	
2-Hydroxybutyrolakton		x	Methyl-2-phenylacetat		x
2-Methoxy-1-methyldiazin-1-oxid		x	Methyl-2-propenyldisulfid	x	
2-Methoxyethoxybenzen		x	Methyl-3-methyl-2-pentenoat		x
2-Methyl-2-butenal		x	Methylacetoxycetat	x	
2-Methyl-2-propensäure	x		Methylglutarat		x
2-Hydroxypropylmethacrylat		x	Methylmethansulfonat	x	
2-Picolin	x		Methylloxoacetat		x
2-Propensäure		x	Methylpropyldisulfid		x
3-Amino-4,5-dimethylfuranon		x	Methylpyruvat		x
3-Hexenylpropanoat		x	Methyl-(2E)4-oxo-2-butenat	x	
3-Methyl-2,5-furandion	x		Methyl-4-oxohexanoat		x
3-Methyl-2-butensäure		x	N,N-Dimethylacetamid	x	
3-Methylphenol	x		N-Methylformamid	x	
3-Okten-2-on	x		N-Methylallylamin		x
3-Pentanon	x		n-Nonadekan	x	
3-tert-Butyl-4-hydroxyanisol	x		Oxoessigsäure		x
4,4-Dimethyl-2-cyclohexen-1-on		x	Phenylacetaldehyd		x
4,4-Dimethylbutyrolakton	x		Sulfurhexafluorid (SF6)	x	
4-Ethylguaiaicol	x		t-Amylmethylether (TAME)	x	
4-Ethylphenol	x		Tetramethylserin		x
4-Methoxy toluen	x		Thiocyclopentadien	x	
4-Methoxy-2-butanon	x		trans-1,2-Dichlorethen		x
4-Methylpentansäure		x	trans-3-Hexen-1-ol		x
4-Hydroxy-6-methyl-2H-Pyran-2-on		x	trans-3-Hexenol-acetat	x	
5-Methyl-3-heptanon	x		trans-Anethol		x
Acetoguaiacon		x	Triethylamin	x	
Allylbenzen	x		Trimethylarginin	x	
Allylmethylsulfid	x		Trimethylglycerat		x
alpha-Phellandren	x		Trimethylserin		x
Benzofuran	x		Trimethyltyrosin	x	
Benzylnitril		x			



Anhang Abbildung 14: HS-SPME-GC-CIMS-Chromatogramme von adsorbervliesgefüllten Probenahmeröhrchen; Ergänzung zu Kapitel 3.4.4

links: nicht-beatmetes Probenahmeröhrchen mit Detektion im CI-Modus (1A) und im EI-Modus (1B); rechts: Untersuchung eines nicht-beatmeten Röhrchens (1), einer Atemluftprobe eines Lungenkrebspatienten (2) und einer Atemprobe eines gesunden Probanden (3) mit Detektion im CI-Modus

Analyse von reseziertem Lungengewebe (Ergänzung zu Kapitel 3.4.5)

Am Tag vor der Probenahme wurden zwei Car/PDMS-Fasern (75 µm) derselben Charge für 60 min bei 300 °C unter Stickstoffatmosphäre ausgeheizt. Diese wurden für den Transport in verschließbare Glasröhrchen mit eingelegtem Silikon/PTFE-Septum gelagert. Darüber hinaus wurden zwei 20 mL-Gewindeials mit Schraubkappen mit Butyl/PTFE-Septen leer gewogen.

Die Beprobung des Lungengewebes fand in den kooperierenden Kliniken in der Pathologie statt. Dafür wurde je ca. 0,5-1,0 cm³ pathologisch unauffälliges Lungengewebe (Nr. xxxx-4) und Tumorgewebe (Nr. xxxx-5) zugeschnitten, mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und durch Abtupfen auf einem Zellstoff grob anhaftendes Blut entfernt. Die Gewebeprobe wurden in je ein Vial gegeben, verschlossen und ausgewogen. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur equilibriert. Das pathologisch unauffällige Gewebe wurde so entnommen, dass es möglichst weit entfernt vom Tumor lokalisiert war. Die SPME-Fasern wurden in manuelle SPME-Halter eingesetzt. Auf die Vials erfolgte das Aufsetzen der Teflon-Adapter, die der Stabilisierung des SPME-Halters dienen sollten. Anschließend wurde der SPME Halter auf die Vials aufgesetzt und die Septen vorsichtig durchstoßen. Die SPME erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Extraktion wurden die Fasern aus den Haltern ausgebaut und in den Glasröhrchen zur Analyse zur BAM transportiert. Die weitere Aufarbeitung der beladenen Fasern mit GC-MS fand binnen 24 h statt. Die Gläser mit den Gewebeprobe wurden zur Entsorgung an den Kliniken belassen.

Im Anschluss erfolgte für beide eingesetzte Fasern die Durchführung einer Qualitätskontrolluntersuchung. Dafür wurden zwei 20 mL-Gewindeials für je 30 s mit synthetischer Luft gespült und anschließend mit Schraubkappen mit Butyl/PTFE-Septen verschlossen. Es folgte die Dotierung von je 10 µL Qualitätskontrollstandardlösung (Anhang Tabelle 37) mittels einer gasdichten Spritze; die Standardkonzentration entspricht der Standardlösung mit dem Konzentrationsniveau Nr. 5, die für die quantitative VOC-Analyse für Atemluftproben in Gassammelrohren im 2. Quartal 2015 eingesetzt

wurde. Danach fand die SPME analog zur Untersuchung der Gewebeprobe statt. Die beladenen SPME-Fasern wurden direkt im Anschluss an die Extraktion mit GC-MS untersucht.

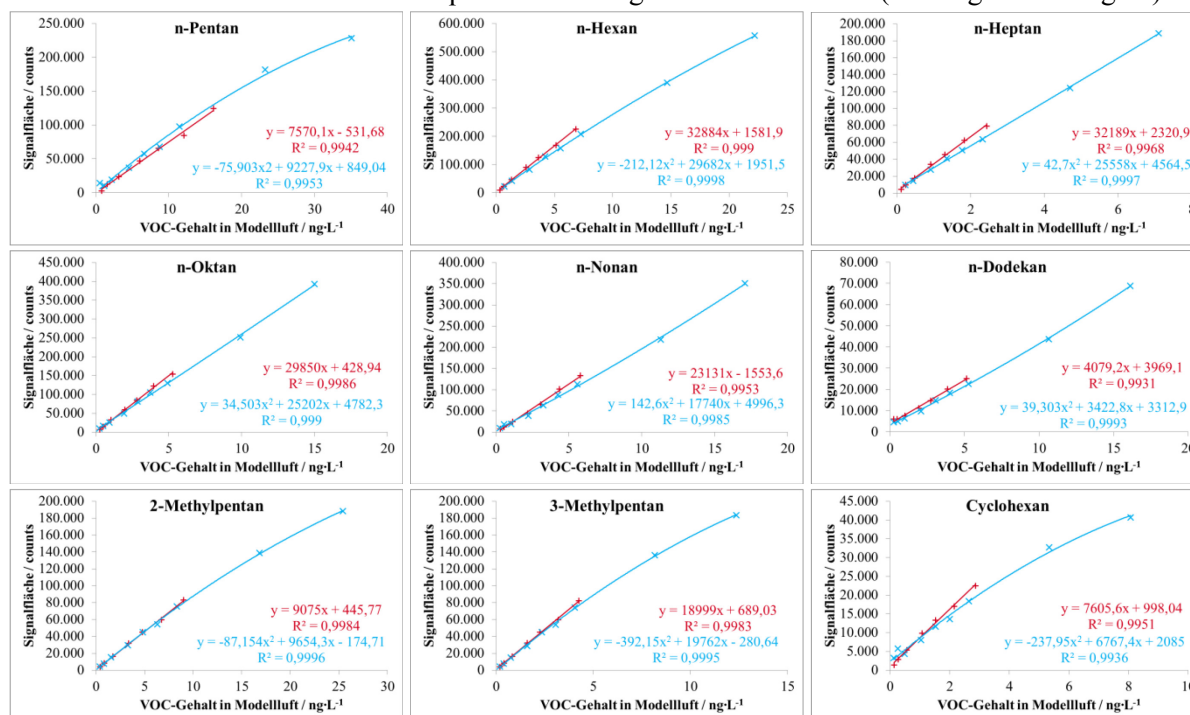
Die Desorption der beladenen SPME-Fasern fand bei 280 °C für 5 min statt, wobei das Splitventil die ersten 3 min geschlossen war. Die GC-MS-Methode richtete sich nach den aus der zweiten Optimierung hervorgegangenen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1 und Kapitel A.2). Dabei erfolgte neben der Aufzeichnung von Scan-Daten für den m/z-Bereich 35-300 u auch parallel die Aufnahme von Daten im SIM-Modus (Anhang Tabelle 17, Seite A-12).

Anhang Tabelle 37: Konzentration in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ von 24 Ziel- und drei Matrix-VOC in methanolischem Qualitätskontrollstandard für die HS-SPME-GC-MS-Analyse von rezeiertem Lungengewebe; Ergänzung zu Kapitel 3.4.5

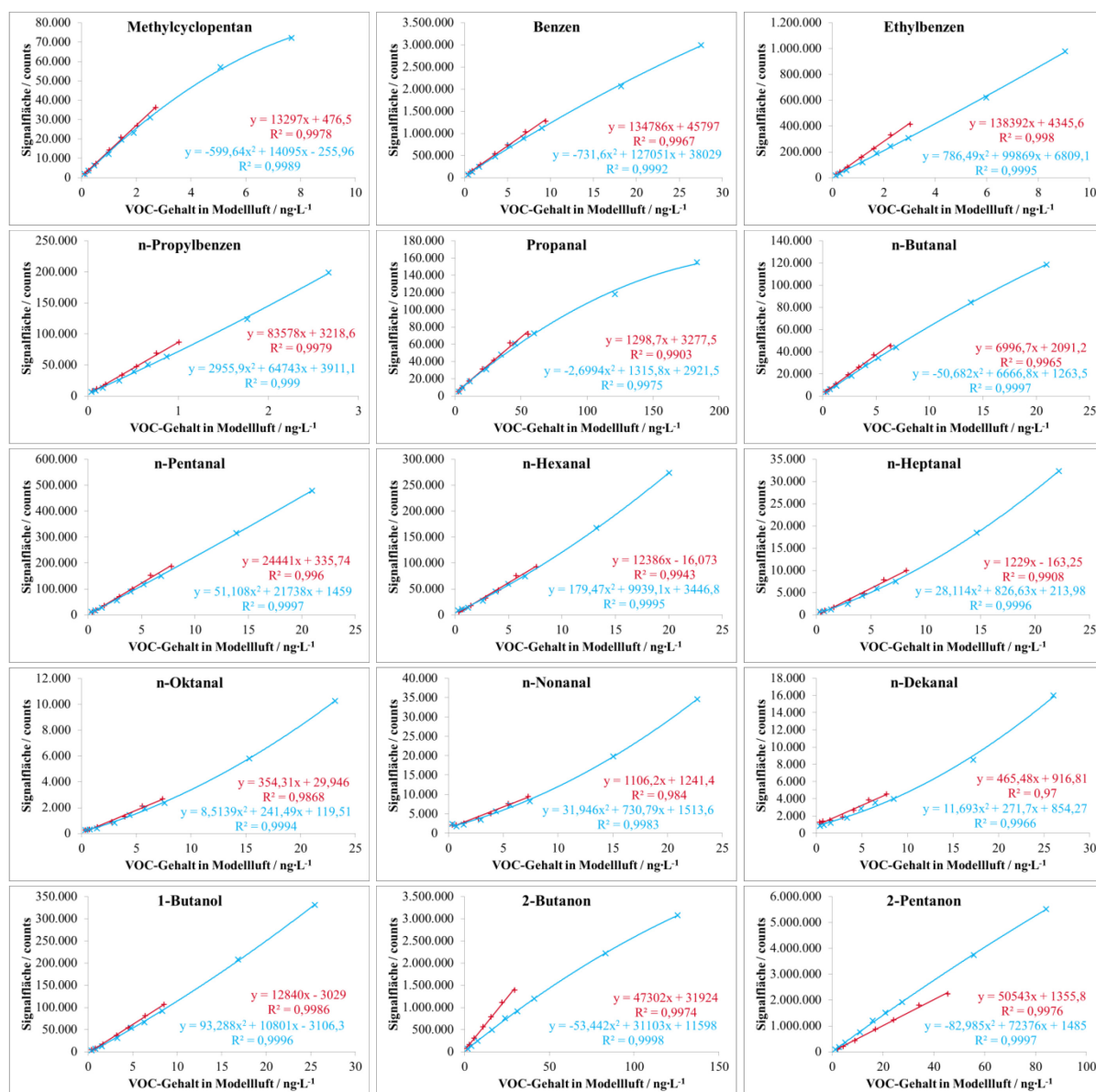
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
n-Pentan	1,14	Cyclohexan	0,20	n-Hexanal	0,60
n-Hexan	0,43	Methylcyclopentan	0,21	n-Heptanal	0,58
n-Heptan	0,19	Benzen	0,62	n-Oktanal	0,62
n-Oktan	0,39	Ethylbenzen	0,24	n-Nonanal	0,58
n-Nonan	0,48	n-Propylbenzen	0,08	n-Dekanal	0,70
n-Dodekan	0,43	Propanal	4,54	1-Butanol	0,59
2-Methylpentan	0,46	n-Butanal	0,55	2-Butanon	3,24
3-Methylpentan	0,34	n-Pentanal	0,62	2-Pentanon	2,25
2-Propanol	379	Aceton	751	Isopren	39

Ergebnisse der Kalibrierung der VOC-Analyse in Atemluftproben in Gassammelrohren (Ergänzung zu Kapitel 4.2.2)

Für die meisten Substanzen war eine quadratische Regression erforderlich (Anhang Abbildung 15).



Anhang Abbildung 15: Vergleich zweier Kalibrierbereiche 1:20 (rot) und 1:70 (blau) für die VOC-Analytik mit HS-SPME-GC-MS in Atemluftproben in Gassammelrohren für 24 Ziel-VOC; Ergänzung zu Kapitel 4.2.2



Anhang Abbildung 15 (Fortsetzung): Vergleich zweier Kalibrierbereiche 1:20 (rot) und 1:70 (blau) für die VOC-Analytik mit HS-SPME-GC-MS in Atemluftproben in Gassammelrohren für 24 Ziel-VOC; Ergänzung zu Kapitel 4.2.2

*Studienpopulation (Ergänzung zu Kapitel 4.2.3)***Anhang Tabelle 38:** Detaillierte Angaben zur Studienpopulation; Ergänzung zu Kapitel 4.2.3

Nr.	Typ	Tumor	Stadium	Alter	Geschlecht	Rauch- verhalten	Nr.	Typ	Alter	Geschlecht	Rauch- verhalten
1	k	AC	1	71	w	ehemalig	38	g	59	w	aktiv
2	k	PEC	3	70	m	aktiv	39	g	60	w	ehemalig
3	k	AC	1	73	w	ehemalig	40	g	59	w	aktiv
4	k	NSCLC	3	73	m	ehemalig	41	g	56	w	ehemalig
5	k	SCLC	2	60	m	aktiv	42	g	51	w	aktiv
6	k	AC	3	70	w	aktiv	43	g	64	m	nie
7	k	PEC	2	61	m	aktiv	44	g	58	m	ehemalig
8	k	AC	4	80	w	ehemalig	45	g	67	m	ehemalig
9	k	PEC	2	64	m	aktiv	46	g	78	w	ehemalig
10	k	PEC	3	71	m	ehemalig	47	g	67	w	ehemalig
11	k	NSCLC	2	67	m	aktiv	48	g	62	w	nie
12	k	SCLC	3	73	m	ehemalig	49	g	53	m	nie
13	k	AC	3	57	w	aktiv	50	g	64	m	nie
14	k	PEC	2	70	m	aktiv	51	g	60	m	aktiv
15	k	PEC	1	70	m	aktiv	52	g	65	m	nie
16	k	SCLC	2	52	w	aktiv	53	g	61	m	nie
17	k	AC	1	78	m	ehemalig	54	g	62	w	nie
18	k	AC	3	54	w	aktiv	55	g	62	w	nie
19	k	AC	1	52	m	aktiv	56	g	63	m	nie
20	k	AC	4	76	w	nie	57	g	62	w	ehemalig
21	k	SCLC, PEC	4	75	m	ehemalig	58	g	57	w	nie
22	k	SCLC	4	60	m	ehemalig	59	g	63	m	nie
23	k	AC	2	56	m	ehemalig	60	g	60	w	nie
24	k	SCLC	4	69	w	aktiv					
25	k	PEC	3	57	m	aktiv					
26	k	SCLC	4	60	m	aktiv					
27	k	PEC	3	65	m	ehemalig					
28	k	AC	1	68	w	nie					
29	k	AC	2	59	m	ehemalig					
30	k	PEC	1	57	m	aktiv					
31	k	AC	4	70	m	aktiv					
32	k	SCLC	1	64	m	aktiv					
33	k	AC	2	57	w	aktiv					
34	k	NSCLC	4	81	m	aktiv					
35	k	PEC	1	64	w	ehemalig					
36	k	PEC	4	63	m	aktiv					
37	k	AC	3	71	w	ehemalig					

k: Lungenkrebspatient, g: Gesunder, m: männlich, w: weiblich, AC: Adenokarzinom, PEC: Plattenepithelkarzinom, SCLC: kleinzelliges Karzinom, NSCLC: nicht-kleinzelliges Karzinom

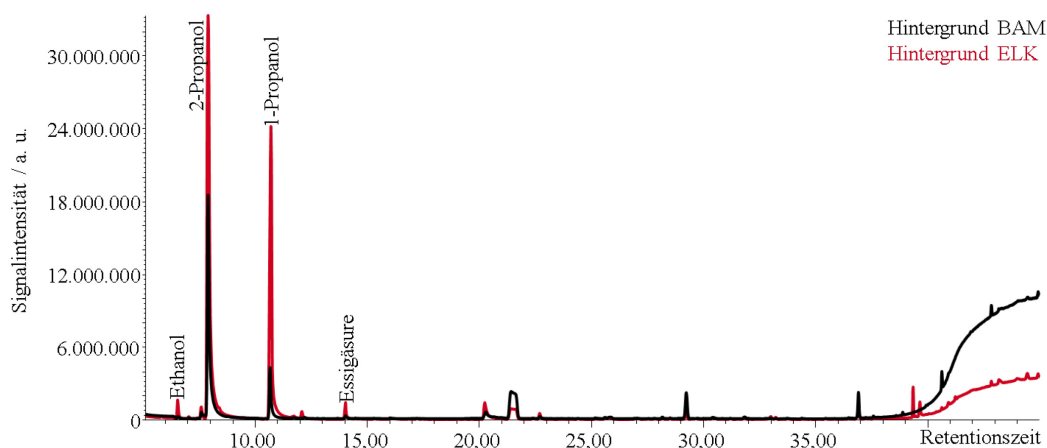
Datenvorbehandlung für die statistische Auswertung (Ergänzung zu Kapitel 4.2.3)

Anhang Tabelle 39: Anzahl der Fehlzeiten für jede Zielsubstanz in insgesamt 60 Atemluftproben und Angabe der verwendeten Stellvertreterwerte; Ergänzung zu Kapitel 4.2.3

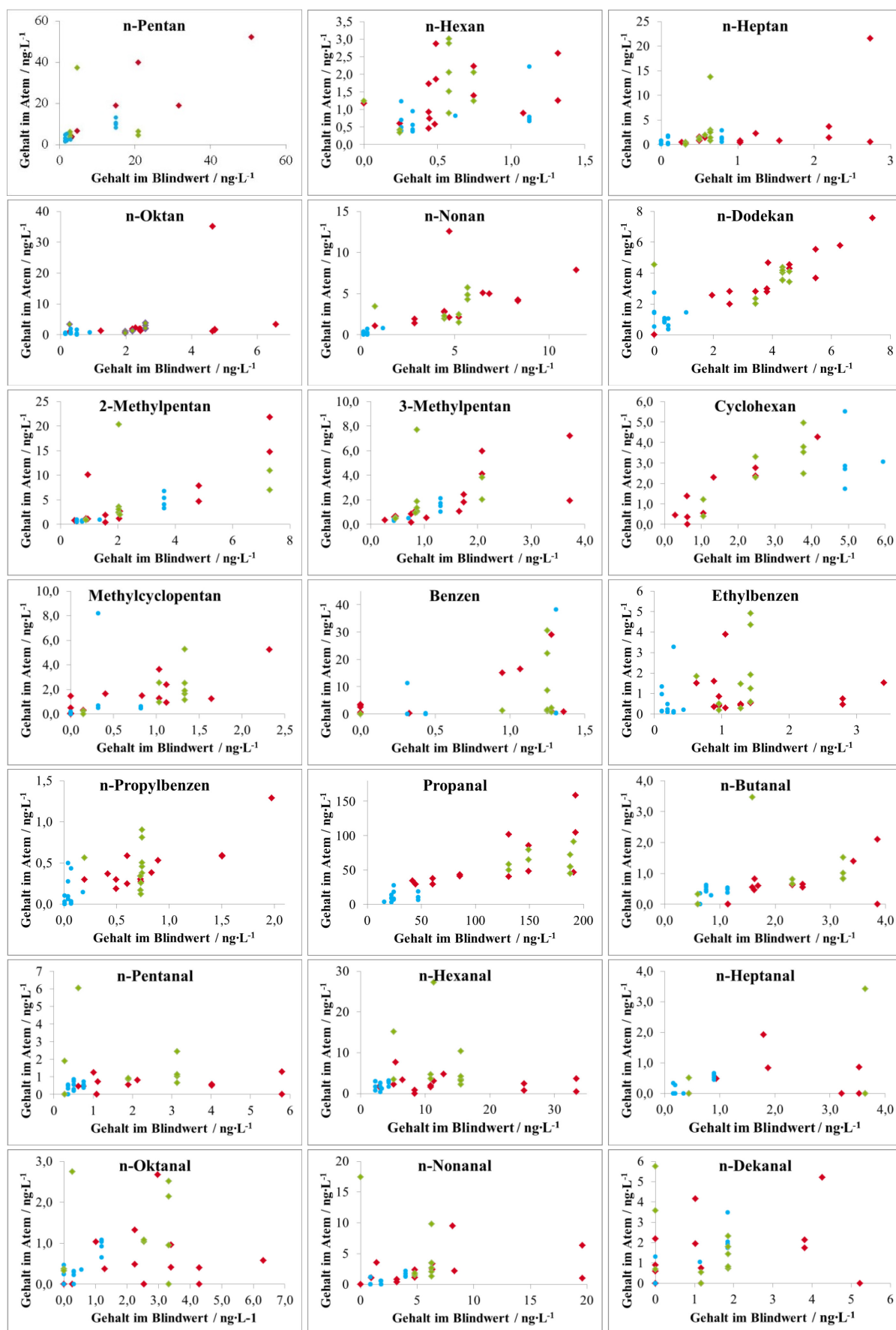
Substanz	Anzahl Fehlzeiten			Stellvertreterwerte		
	n. d.	n. a.	n. e.	n. d.	n. a.	n. e.
n-Pentan			4	0,070	6,10	59,1
n-Hexan				0,086	1,01	23,6
n-Heptan	3			0,044	0,97	8,7
n-Oktan	1			0,055	1,00	18,6
n-Nonan	4	10		0,078	1,91	19,8
n-Dodekan	1			0,129	2,01	21,8
2-Methylpentan			1	0,070	1,69	27,0
3-Methylpentan	1			0,042	0,79	15,9
Methylcyclopentan	4	14		0,030	1,06	9,3
Cyclohexan			9	0,036	2,07	9,8
Benzen	16		1	0,104	1,52	34,4
Ethylbenzen				0,034	1,14	11,0
n-Propylbenzen	2	1		0,0005	0,32	3,4
Propanal		2	1	0,599	52,4	214
n-Butanal	6	4		0,109	0,82	26,4
n-Pentanal	4	1		0,091	0,73	26,2
n-Hexanal				0,069	3,09	28,3
n-Heptanal	17	18		0,072	0,56	28,7
n-Oktanal	11	5		0,108	0,90	29,4
n-Nonanal	10	1		0,172	1,85	28,9
n-Dekanal	12	7		0,062	1,92	29,5
1-Butanol				0,123	4,04	30,1
2-Butanon		1		0,415	6,23	159
2-Pentanon				0,259	2,94	106

n. a.: nicht auswertbar aufgrund von Koelution, n. d.: nicht detektierbar, n. e.: nicht erfassbar, weil Auswertung mit quadratischer Regressionsfunktion zu einem fehlerhaften Ergebnis führt

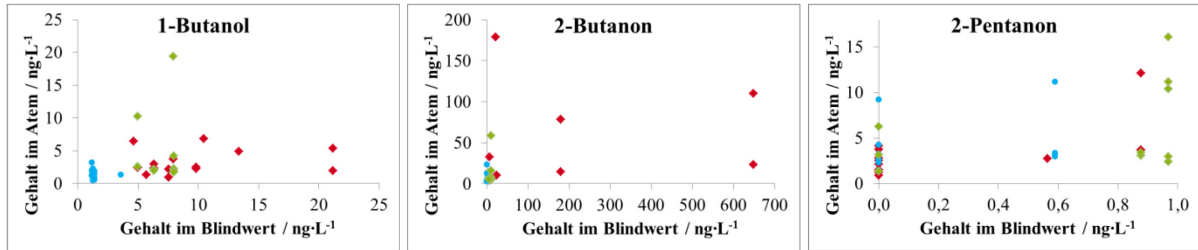
Grafische Darstellung der Studiendaten zur Ermittlung eines Blindwerteinflusses (Ergänzung zu Kapitel 4.2.4)



Anhang Abbildung 16: HS-SPME-GC-MS-Chromatogramme von Blindwertproben aus den Atemluftprobenahmeräumen der BAM (schwarz) und der ELK (rot); es ist eine Dominanz der Signale von 1- und 2-Propanol zu beobachten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.4



Anhang Abbildung 17: Auftragung der mit HS-SPME-GC-MS analysierten VOC-Gehalte in Atemluftproben gegen Blindwertproben; rot: Patienten ELK, grün: Gesunde ELK, blau: Gesunde BAM; Ergänzung zu Kapitel 4.2.4



Anhang Abbildung 17 (Fortsetzung): Auftragung der mit HS-SPME-GC-MS analysierten VOC-Gehalte in Atemluftproben gegen Blindwertproben; rot: Patienten ELK, grün: Gesunde ELK, blau: Gesunde BAM; Ergänzung zu Kapitel 4.2.4

Umrechnung von VOC-Gehalten in der Atemluft aus der Literatur mit abweichenden Einheiten zwecks Vergleichbarkeit (Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6)

In der Literatur finden sich verschiedene Konzentrationsangaben für VOC in der Atemluft. Häufig verbreitet sind parts-per-Angaben und molare Konzentrationen. Die Umrechnung der molaren Gehalte c_n in massenbezogene Gehalte c_m , wie sie im Rahmen dieser Arbeit in den Atemluftproben bestimmt wurden, erfolgt über die molare Masse M nach Formel (11):

$$c_m = \frac{m}{V_g} = \frac{n \cdot M}{V_g} = M \cdot \left(\frac{n}{V_g} \right) = M \cdot c_n \quad (11)$$

c_m : massenbezogener Gehalt der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

m : absolute Masse der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit ng

V_g : Volumen der Atemluftprobe in der Einheit L

n : absolute Stoffmenge der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit nmol

M : molare Masse der Zielsubstanz in der Einheit $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

c_n : molarer Gehalt der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Die Umrechnung von parts-per-Angaben ist schwieriger, da nur selten exakt beschrieben wird, ob es sich um eine Angabe Masse-je-Masse, Volumen-je-Volumen, Stoffmenge-je-Stoffmenge oder auch Stoffmenge-je-Volumen oder Masse-je-Volumen handelt. Wird ein Stoffmengenbezug β_n vorausgesetzt, wie es bei Untersuchungen zur Luftverschmutzung üblich ist, so ergibt sich der Zusammenhang über das molare Volumen V_m eines idealen Gases ($24,465 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei 25°C und Normaldruck) und die molare Masse M der zu betrachtenden Substanz (Formel (12)):

$$c_m = \frac{m}{V_g} = \frac{(n \cdot M)}{\left(\frac{n_g \cdot R \cdot T \cdot 10^3}{p} \right)} = \left(\frac{M \cdot p}{R \cdot T \cdot 10^3} \right) \cdot \left(\frac{n}{n_g} \right) = \left(\frac{M \cdot p}{R \cdot T \cdot 10^3} \right) \cdot \beta_n = \left(\frac{M}{V_m} \right) \cdot \beta_n \quad (12)$$

c_m : massenbezogener Gehalt der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

m : absolute Masse der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit ng

V_g : Volumen der Atemluftprobe in der Einheit L

n : absolute Stoffmenge der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit nmol

M : molare Masse der Zielsubstanz in der Einheit $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

n_g : Stoffmenge der gasförmigen Matrix der Atemluftprobe in der Einheit mol

R : universelle Gaskonstante, ca. $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ bzw. $8,314 \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

T : Temperatur in der Einheit K

p : Luftdruck in der Einheit Pa bzw. $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$

10^3 : Faktor zur Umrechnung von m^3 in L

β_n : molare Konzentration der Zielsubstanz in der Atemluftprobe in der Einheit ppb_v (10^{-9})

V_m : molares Volumen eines idealen Gases, ca. $24,465 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei $298,15 \text{ K}$ und 101325 Pa

Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Einheiten für die 24 Zielsubstanzen findet sich in Anhang Tabelle 40.

Anhang Tabelle 40: Umrechnung der Gehalte der 24 Ziel-VOC in verschiedene Konzentrationen; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6

Substanz	Molare Masse M / $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	VOC-Gehalt c_m / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	VOC-Gehalt c_n / $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$	VOC-Gehalt β_n / ppb_V
n-Pentan	72,15	1,00	13,86	0,34
n-Hexan	86,18	1,00	11,60	0,28
n-Heptan	100,21	1,00	9,98	0,24
n-Oktan	114,23	1,00	8,75	0,21
n-Nonan	128,26	1,00	7,80	0,19
n-Dodekan	170,34	1,00	5,87	0,14
2-Methylpentan	86,18	1,00	11,60	0,28
3-Methylpentan	86,18	1,00	11,60	0,28
Cyclohexan	84,16	1,00	11,88	0,29
Methylcyclopentan	84,16	1,00	11,88	0,29
Benzen	78,11	1,00	12,80	0,31
Ethylbenzen	106,17	1,00	9,42	0,23
n-Propylbenzen	120,19	1,00	8,32	0,20
Propanal	58,08	1,00	17,22	0,42
n-Butanal	72,11	1,00	13,87	0,34
n-Pentanal	86,13	1,00	11,61	0,28
n-Hexanal	100,16	1,00	9,98	0,24
n-Heptanal	114,19	1,00	8,76	0,21
n-Oktanal	128,21	1,00	7,80	0,19
n-Nonanal	142,24	1,00	7,03	0,17
n-Dekanal	156,27	1,00	6,40	0,16
1-Butanol	74,12	1,00	13,49	0,33
2-Butanon	72,11	1,00	13,87	0,34
2-Pentanon	86,13	1,00	11,61	0,28

Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Median (Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6)

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i \quad (13)$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\bar{x}} \quad (14)$$

$$\tilde{x} = \begin{cases} \frac{x_{n+1}}{2} & \text{für } n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right) & \text{für } n \text{ gerade} \end{cases} \quad (15)$$

\bar{x} : Mittelwert der Messwertreihe

$s_{\bar{x}}$: Standardabweichung des Mittelwertes (Standardfehler)

\tilde{x} : Median

n : Anzahl der Messwerte

x_i : einzelner Messwert

Erläuterung der Boxplots (Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6)

Die Querlinie in der Box entspricht dem Median. Das kleine Quadrat, welches im Allgemeinen in der Box liegt, ist der Mittelwert. Die Box selbst wird durch das zweite und dritte Quartil begrenzt und enthält folglich die mittleren 50 % der Daten. Die Länge der Antennen (Whisker) wird durch den Messwert bestimmt, der noch innerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands liegt. Die Sterne kennzeichnen den größten und den kleinsten Wert.

Univariate statistische Auswertung der Studiendaten (Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6)

Anhang Tabelle 41: Test der in Atemluft analysierten VOC-Gehalte auf Normalverteilung mit fünf verschiedenen Tests für die Gruppen nicht-aktive und aktive Raucher sowie Lungenkrebspatienten und Gesunde ($\alpha = 0,05$); Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6

	nicht-aktive Raucher (n=35)						aktive Raucher (n=25)					
	1	2	3	4	5	gesamt	1	2	3	4	5	gesamt
n-Pentan	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Hexan	n	n	n	n	n	n	j	n	j	j	j	j
n-Heptan	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Oktan	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Dodekan	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
2-Methylpentan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
3-Methylpentan	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
Cyclohexan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
Benzen	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
Ethylbenzen	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Propylbenzen	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
Propanal	n	j	j	j	n	j	n	n	j	n	n	n
n-Butanal	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Pentanal	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Hexanal	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Oktanal	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
n-Nonanal	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Dekanal	n	n	j	n	n	n	n	j	j	n	n	n
1-Butanol	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
2-Butanon	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
2-Pentanon	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n

	Lungenkrebspatienten (n=37)						Gesunde (n=23)					
	1	2	3	4	5	gesamt	1	2	3	4	5	gesamt
n-Pentan	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Hexan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Heptan	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Oktan	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
n-Dodekan	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
2-Methylpentan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
3-Methylpentan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
Cyclohexan	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
Benzen	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ethylbenzen	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Propylbenzen	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
Propanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Butanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Pentanal	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Hexanal	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Oktanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Nonanal	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Dekanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
1-Butanol	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
2-Butanon	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
2-Pentanon	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n

j: normalverteilt, n: nicht normalverteilt; Tests auf Normalverteilung nach 1: Shapiro-Wilk, 2: Lilliefors, 3: Kolmogorov-Smirnov, 4: Anderson-Darling, 5: Chen-Shapiro

Anhang Tabelle 42: Test der in Atemluft analysierten, logarithmierten VOC-Gehalte auf Normalverteilung mit fünf verschiedenen Tests für die Gruppen nicht-aktive und aktive Raucher sowie Lungenkrebspatienten und Gesunde ($\alpha = 0,05$); Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6

	nicht-aktive Raucher (n=35)						aktive Raucher (n=25)					
	1	2	3	4	5	gesamt	1	2	3	4	5	gesamt
n-Pentan	n	n	j	n	n	n	n	j	j	n	n	n
n-Hexan	n	n	j	n	n	n	j	j	j	j	j	j
n-Heptan	n	n	j	n	n	n	n	j	j	n	n	n
n-Oktan	j	j	j	j	j	j	n	n	j	n	n	n
n-Dodekan	n	n	j	n	n	n	j	j	j	j	j	j
2-Methylpentan	n	n	j	n	n	n	j	j	j	j	j	j
3-Methylpentan	n	n	j	n	n	n	n	n	j	j	n	n
Cyclohexan	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j
Benzen	n	n	n	n	n	n	j	j	j	j	j	j
Ethylbenzen	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j
n-Propylbenzen	n	n	j	n	n	n	j	j	j	j	j	j
Propanal	n	n	j	n	n	n	j	j	j	j	j	j
n-Butanal	j	j	j	j	j	j	n	n	j	n	n	n
n-Pentanal	j	j	j	j	j	j	n	n	j	n	n	n
n-Hexanal	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j
n-Oktanal	n	n	j	n	n	n	j	j	j	j	j	j
n-Nonanal	n	n	j	n	n	n	j	j	j	j	j	j
n-Dekanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
1-Butanol	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j
2-Butanon	n	j	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
2-Pentanon	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j

	Lungenkrebskranke (n=37)						Gesunde (n=23)					
	1	2	3	4	5	gesamt	1	2	3	4	5	gesamt
n-Pentan	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Hexan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Heptan	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Oktan	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
n-Dodekan	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
2-Methylpentan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
3-Methylpentan	n	n	n	n	n	n	n	n	j	n	n	n
Cyclohexan	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
Benzen	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ethylbenzen	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Propylbenzen	n	n	n	n	n	n	n	j	j	n	n	n
Propanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Butanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Pentanal	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Hexanal	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Oktanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
n-Nonanal	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n-Dekanal	n	n	j	n	n	n	n	n	j	n	n	n
1-Butanol	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n
2-Butanon	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
2-Pentanon	n	n	j	n	n	n	n	n	n	n	n	n

j: normalverteilt, n: nicht normalverteilt; Tests auf Normalverteilung nach 1: Shapiro-Wilk, 2: Lilliefors, 3: Kolmogorov-Smirnov, 4: Anderson-Darling, 5: Chen-Shapiro

Anhang Tabelle 43: Vergleich von in Atemluft analysierten VOC-Gehalten in ng-L⁻¹ für alle Nichtraucher mit allen aktiven Rauchern sowie für alle Lungenkrebspatienten mit allen Gesunden mit dem Mann-Whitney-U-Test; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6

	Nichtraucher (n=35)					aktiver Raucher (n=25)					MWU	
	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\tilde{x}	min	max	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\tilde{x}	min	max	p	
<i>n-Pentan</i>	17,3	6,1	4,9	1,5	197	13,0	2,9	6,8	2,8	59,1	0,0476	*
n-Hexan	3,0	2,1	0,8	0,3	72,3	1,7	0,2	1,7	0,6	3,4	0,0011	*
n-Heptan	3,4	2,2	0,8	0,0	76,5	2,4	0,9	1,4	0,3	21,6	0,0018	*
n-Oktan	1,3	0,2	0,9	0,1	4,8	3,0	1,4	1,2	0,6	35,1	0,0365	*
<i>n-Dodekan</i>	2,6	0,4	1,9	0,4	8,7	3,0	0,5	2,2	0,1	9,9	0,5615	
<i>2-Methylpentan</i>	3,9	1,1	1,0	0,4	27,0	2,9	0,5	2,0	0,8	10,1	0,0903	
<i>3-Methylpentan</i>	1,4	0,4	0,6	0,2	7,7	1,1	0,2	0,9	0,0	3,4	0,2096	
<i>Cyclohexan</i>	5,1	1,0	2,8	0,4	24,8	3,3	0,7	1,8	0,6	12,9	0,1420	
Benzen	1,0	0,4	0,3	0,1	11,3	16,1	2,3	13,6	2,2	38,4	<0,0001	***
Ethylbenzen	0,7	0,2	0,5	0,1	3,2	2,3	0,3	1,7	0,4	5,0	<0,0001	***
<i>n-Propylbenzen</i>	0,29	0,05	0,26	0,00	1,29	0,51	0,07	0,41	0,19	1,34	0,0008	***
<i>Propanal</i>	49,8	6,5	50,6	3,1	158	76,0	10,0	55,3	13,3	214	0,0503	
n-Butanal	0,9	0,2	0,8	0,1	3,5	1,0	0,2	0,8	0,1	3,3	0,3155	
n-Pentanal	1,0	0,2	0,7	0,1	6,0	1,3	0,4	0,7	0,1	11,0	0,9259	
n-Hexanal	5,1	1,0	3,1	0,3	27,3	6,0	2,4	3,0	0,5	60,5	0,8817	
n-Oktanal	0,9	0,2	0,9	0,1	3,7	0,9	0,2	0,6	0,1	2,8	0,8577	
n-Nonanal	2,5	0,6	1,7	0,2	17,5	2,6	0,7	2,0	0,2	13,8	0,7008	
n-Dekanal	2,1	0,4	1,9	0,3	7,4	2,1	0,4	1,9	0,3	7,9	0,9551	
1-Butanol	6,6	1,2	2,9	0,5	25,6	7,3	1,7	4,7	1,4	41,0	0,2827	
2-Butanon	7,4	1,4	4,9	2,4	46,2	21,6	8,0	7,8	3,4	179	0,0060	*
2-Pentanon	3,2	0,3	2,8	0,9	11,2	4,7	0,8	3,5	1,2	16,1	0,1307	
	lungenkrebskranker Studienteilnehmer (n=37)					gesunder Studienteilnehmer (n=23)					MWU	
	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\tilde{x}	min	max	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\tilde{x}	min	max	p	
<i>n-Pentan</i>	18,0	5,6	6,6	2,8	197	11,4	3,5	5,1	1,5	59,1	0,1134	
n-Hexan	3,3	2,0	1,2	0,4	72,3	1,1	0,2	0,8	0,3	3,0	0,1216	
n-Heptan	3,8	2,1	1,0	0,3	76,5	1,7	0,6	1,0	0,0	13,7	0,5359	
n-Oktan	2,4	1,0	1,0	0,3	35,1	1,3	0,3	0,9	0,1	3,9	0,1540	
<i>n-Dodekan</i>	3,1	0,4	2,2	0,1	9,9	2,2	0,3	1,5	0,4	4,5	0,1253	
<i>2-Methylpentan</i>	3,5	0,9	1,7	0,4	27,0	3,5	1,0	1,9	0,5	20,3	0,9399	
<i>3-Methylpentan</i>	1,3	0,3	0,8	0,0	7,2	1,3	0,4	0,9	0,3	7,7	0,9880	
<i>Cyclohexan</i>	3,3	0,8	1,7	0,4	24,8	6,0	1,0	4,8	0,4	19,0	0,0003	***
Benzen	8,5	1,8	3,4	0,1	38,4	5,2	2,3	0,3	0,1	38,2	0,0253	*
Ethylbenzen	1,6	0,2	1,4	0,2	5,0	1,1	0,3	0,5	0,1	4,9	0,0061	*
<i>n-Propylbenzen</i>	0,45	0,06	0,33	0,06	1,34	0,27	0,06	0,17	0,00	0,17	0,0215	*
<i>Propanal</i>	73,4	6,5	58,5	24,2	158	40,2	9,8	18,3	3,1	214	0,0005	***
n-Butanal	1,2	0,2	1,0	0,1	3,3	0,7	0,2	0,5	0,1	3,5	0,0004	***
n-Pentanal	1,3	0,3	0,9	0,1	11,0	1,0	0,3	0,7	0,1	6,0	0,1243	
n-Hexanal	6,1	1,7	3,3	0,5	60,5	4,6	1,3	3,0	0,3	27,3	0,2628	
n-Oktanal	0,9	0,2	0,9	0,1	3,7	0,8	0,2	0,5	0,1	2,7	0,3791	
n-Nonanal	2,6	0,5	2,0	0,2	13,8	2,5	0,8	1,3	0,2	17,5	0,2568	
n-Dekanal	2,5	0,4	1,9	0,3	7,9	1,4	0,3	0,8	0,3	5,7	0,0025	*
1-Butanol	9,3	1,4	6,4	1,4	41,0	3,0	0,9	1,9	0,5	19,4	<0,0001	***
2-Butanon	16,3	5,5	6,9	3,4	179	8,5	2,5	4,8	2,4	58,2	0,0169	*
2-Pentanon	3,1	0,3	2,8	0,9	8,7	4,9	0,9	3,1	1,3	16,1	0,1412	

MWU: p -Wert ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test, *: signifikant ($p < 0,05$), ***: höchst signifikant ($p < 0,001$)

kursiv: Substanz wurde als hintergrundbeeinflusst festgestellt

\bar{x} : Mittelwert, $s_{\bar{x}}$: Standardabweichung des Mittelwerts, \tilde{x} : Median, min: Minimum, max: Maximum

Anhang Tabelle 44: Kenndaten der in Atemluft analysierten VOC-Gehalte in ng·L⁻¹ in den Untergruppen gesunde Nichtraucher, gesunde aktive Raucher, lungenkrebskranker Nichtraucher und lungenkrebskranker aktive Raucher; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6

	gesunder Nichtraucher (n=19)					gesunder aktiver Raucher (n=4)					lungenkrebskranker Nichtraucher (n=16)					lungenkrebskranker aktiver Raucher (n=21)				
	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\bar{x}	min	max	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\bar{x}	min	max	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\bar{x}	min	max	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	\bar{x}	min	max
<i>n-Pentan</i>	12,1	4,2	4,8	1,5	59,1	7,7	1,9	6,2	5,1	13,2	23,3	12,3	5,6	3,2	197	14,0	3,4	8,0	2,8	59,1
<i>n-Hexan</i>	0,9	0,1	0,7	0,3	2,9	2,2	0,3	2,1	1,5	3,0	5,6	4,5	0,8	0,4	72,3	1,6	0,2	1,3	0,6	3,4
<i>n-Heptan</i>	1,5	0,7	0,8	0,0	13,7	2,4	0,4	2,7	1,4	3,0	5,7	4,7	0,8	0,4	76,5	2,4	1,0	1,2	0,3	21,6
<i>n-Oktan</i>	0,9	0,2	0,6	0,1	3,4	3,1	0,5	3,4	1,6	3,9	1,7	0,4	1,1	0,3	4,8	3,0	1,6	0,9	0,6	35,1
<i>n-Dodekan</i>	1,9	0,3	1,5	0,4	4,5	3,4	0,8	4,1	1,0	4,4	3,3	0,6	2,7	0,8	8,7	2,9	0,6	2,0	0,1	9,9
<i>2-Methylpentan</i>	3,3	1,1	0,9	0,5	20,3	4,0	1,0	3,3	2,5	6,7	4,6	2,0	1,5	0,4	27,0	2,7	0,5	1,7	0,8	10,1
<i>3-Methylpentan</i>	1,3	0,4	0,5	0,3	7,7	1,6	0,2	1,6	1,1	2,1	1,6	0,5	0,8	0,2	7,2	1,0	0,2	0,8	0,0	3,4
<i>Cyclohexan</i>	6,1	1,1	4,8	0,4	19,0	5,5	1,5	4,4	3,5	9,8	4,0	1,5	1,9	0,4	24,8	2,9	0,8	1,5	0,6	12,9
<i>Benzen</i>	1,1	0,6	0,2	0,1	11,3	24,9	6,3	26,4	8,7	38,2	0,9	0,4	0,4	0,1	6,1	14,4	2,3	11,0	2,2	38,4
<i>Ethylbenzen</i>	0,5	0,1	0,2	0,1	1,8	3,6	0,7	3,8	1,9	4,9	0,9	0,2	0,6	0,2	3,2	2,1	0,3	1,6	0,4	5,0
<i>n-Propylbenzen</i>	0,19	0,04	0,12	0,00	0,56	0,65	0,12	0,63	0,43	0,90	0,40	0,08	0,32	0,06	1,29	0,48	0,07	0,37	0,19	1,34
<i>Propanal</i>	30,1	6,5	18,0	3,1	179	88,4	43,6	63,2	13,3	214	73,1	9,0	62,6	24,2	158	73,6	9,4	55,3	29,0	179
<i>n-Butanal</i>	0,6	0,2	0,5	0,1	3,5	0,8	0,3	0,8	0,1	1,5	1,3	0,2	1,2	0,5	2,4	1,1	0,2	0,9	0,1	3,3
<i>n-Pentanal</i>	0,9	0,3	0,6	0,1	6,0	1,2	0,4	0,9	0,5	2,4	1,2	0,2	1,1	0,3	2,6	1,3	0,5	0,7	0,1	11,0
<i>n-Hexanal</i>	4,4	1,5	2,9	0,3	27,3	5,1	1,8	3,8	2,5	10,4	6,0	1,2	4,5	1,1	18,7	6,1	2,8	3,0	0,5	60,5
<i>n-Oktanal</i>	0,6	0,1	0,4	0,1	2,7	1,5	0,5	1,5	0,3	2,5	1,1	0,2	0,9	0,1	3,7	0,8	0,1	0,6	0,1	2,8
<i>n-Nonanal</i>	2,2	0,9	1,3	0,2	17,5	3,9	2,1	2,8	0,2	9,8	2,9	0,6	2,4	0,2	9,5	2,4	0,6	1,9	0,2	13,8
<i>n-Dekanal</i>	1,3	0,4	0,7	0,3	5,7	1,5	0,4	1,6	0,3	2,3	3,0	0,5	2,1	0,8	7,4	2,2	0,4	1,9	0,3	7,9
<i>1-Butanol</i>	3,0	1,0	1,9	0,5	19,4	2,6	0,5	2,2	1,7	4,2	10,8	1,8	10,1	2,6	25,6	8,2	1,9	5,1	1,4	41,0
<i>2-Butanol</i>	4,8	0,7	4,6	2,4	12,6	26,2	11,1	19,3	7,9	58,2	10,4	2,7	6,6	3,8	46,2	20,7	9,3	6,9	3,4	179
<i>2-Pentanol</i>	3,4	0,5	3,0	1,3	11,2	11,7	1,5	10,8	9,2	16,1	2,9	0,3	2,7	0,9	6,2	3,3	0,4	2,9	1,2	8,7

kursiv: Substanz wurde als Hintergrundbeeinflussung festgestellt

\bar{x} : Mittelwert, $s_{\bar{x}}$: Standardabweichung des Mittelwerts, \bar{x} : Median, min: Minimum, max: Maximum

Anhang Tabelle 45: Vergleich von in Atemluft analysierten VOC-Gehalten für gesunde Nichtraucher (n=19), gesunde aktive Raucher (n=4), lungenkrebskranke Nichtraucher (n=16) und lungenkrebskranke aktiven Raucher (n=21) mit dem Mann-Whitney-U-Test; Ergänzung zu Kapitel 4.2.5 und 4.2.6

	gesunde Nichtraucher gegen gesunde Raucher		erkrankte Nichtraucher gegen erkrankte Raucher		gesunde Nichtraucher gegen erkrankte Nichtraucher		gesunde Raucher gegen erkrankte Raucher
	<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
<i>n</i> -Pentan	0,3551		0,1974		0,3670		0,5431
n-Hexan	0,0041	*	0,1226		0,2569		0,1537
n-Heptan	0,0160	*	0,0249	*	0,6587		0,0466
n-Oktan	0,0041	*	0,9879		0,0763		0,0307
<i>n</i> -Dodekan	0,0811		0,4759		0,0355	*	0,5918
2-Methylpentan	0,1617		0,3542		1,0000		0,0963
3-Methylpentan	0,0666		0,7969		0,9089		0,0681
Cyclohexan	0,7383		0,7505		0,0202	*	0,0191
Benzen	0,0005	***	<0,0001	***	0,7245		0,1323
Ethylbenzen	0,0002	***	<0,0001	***	0,0263	*	0,0381
<i>n</i> -Propylbenzen	0,0061	*	0,2290		0,0277	*	0,0814
Propanal	0,0974		0,6770		0,0005	***	0,9714
n-Butanal	0,2891		0,1975		0,0002	***	0,7481
n-Pentanal	0,1877		0,1452		0,0237	*	0,4934
n-Hexanal	0,1884		0,1384		0,0417	*	0,3687
n-Oktanal	0,1599		0,1657		0,1169		0,2286
n-Nonanal	0,2841		0,4206		0,0935		0,5915
n-Dekanal	0,5156		0,1119		0,0007	***	0,4506
1-Butanol	0,2182		0,0778		<0,0001	***	0,0381
2-Butanon	0,0009	***	0,8440		0,0023	*	0,0381
2-Pentanon	0,0009	***	0,3868		0,3674		0,0002

kursiv: Substanz wurde als hintergrundbeeinflusst festgestellt

*: signifikant bei Signifikanzniveau $\alpha=0,05$, ***: höchst signifikant bei Signifikanzniveau $\alpha=0,001$

Anhang Tabelle 46: Matrix von Pearson'schen Korrelationskoeffizienten für die in Atemluft analysierten VOC-Gehalte für 60 Studienproben (Koeffizienten $>0,50$ weisen auf ein ähnliches Verhalten der zwei Substanzen in den Proben hin); Ergänzung zu Kapitel 4.2.6

[illegible]

Lineare Diskriminanzanalyse und hierarchische Clusteranalyse (Ergänzung zu Kapitel 4.2.6)

Anhang Tabelle 47: Faktoren der linearen Diskriminanzfunktion für ein Modell mit 19 Analyten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.6

Analyt	Faktor	Analyt	Faktor	Analyt	Faktor
n-Pentan	-0,09022	Benzen	-0,72192	n-Nonanal	0,14767
n-Hexan	-0,23665	Ethylbenzen	0,52487	n-Dekanal	-0,36429
n-Heptan	-0,12874	n-Propylbenzen	0,29928	1-Butanol	-1,8412
n-Oktan	-0,41585	Propanal	0,00564	2-Butanon	-0,24293
n-Dodekan	-0,28540	n-Butanal	-0,26896	2-Pentanon	0,33516
3-Methylpentan	0,11015	n-Hexanal	1,51156		
Cyclohexan	0,71555	n-Oktanal	0,15576		
kanonische Gruppenmittelwerte					
Lungenkrebskranke	-1,34252				
Gesunde	2,15970				
Entscheidungswert für die Zurordnung eines Objektes in eine Gruppe					
	0,40859				

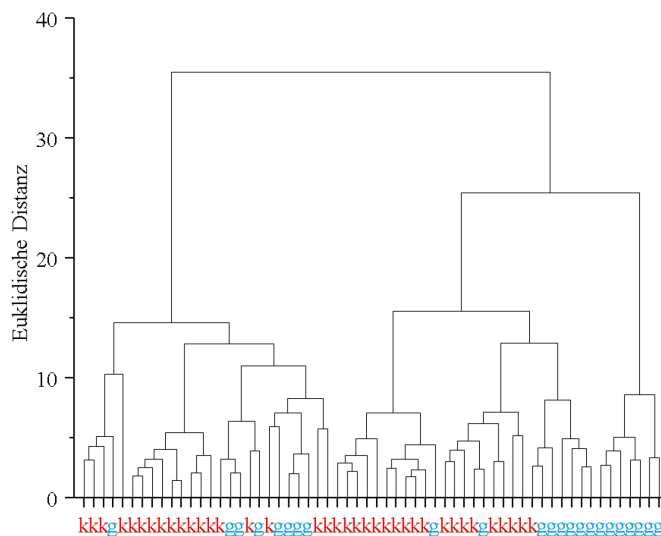
Anhang Tabelle 48: Faktoren der linearen Diskriminanzfunktion für drei Modelle mit vier bis sieben Analyten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.6

Ansatz 1		Ansatz 2		Ansatz 3	
Analyt	Faktor	Analyt	Faktor	Analyt	Faktor
n-Hexan	-0,54619	n-Dekanal	0,14351	n-Hexanal	1,26656
3-Methylpentan	0,00370	1-Butanol	0,96977	1-Butanol	-1,63401
Cyclohexan	0,68391	2-Butanon	0,44972	2-Butanon	-0,31741
n-Nonanal	0,34704	2-Pentanon	-0,50916	2-Pentanon	0,24515
1-Butanol	-0,81495				
2-Butanon	-0,48378				
2-Pentanon	0,48795				
kanonische Gruppenmittelwerte					
Lungenkrebskranke	-0,86319	Lungenkrebskranke	0,70089	Lungenkrebskranke	-0,97301
Gesunde	1,38861	Gesunde	-1,12752	Gesunde	1,56528
Entscheidungswerte für die Zurordnung eines Objektes in eine Gruppe					
	0,26271		-0,21332		0,29614

Ansatz 1: Reduktion von Redundanz auf Basis der Korrelationskoeffizienten

Ansatz 2: Ausschluss von störgrößenbeeinflussten Analyten

Ansatz 3: Analytauswahl nach Vorerfahrung



Anhang Abbildung 18: Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse nach Ward mit 19 Variablen; k: Lungenkrebskranke, g: Gesunder; Ergänzung zu Kapitel 4.2.6

Verlaufsanalysen (Ergänzung zu Kapitel 4.2.7)

Anhang Tabelle 49: Vergleich der in Atemluft analysierten VOC-Gehalte in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ von zwei Lungenkrebspatienten vor Behandlungsbeginn und 3 Monate nach der Tumorresektion (Verlaufskontrolluntersuchung); Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

	Verlaufskontroll-Patient 1		Verlaufskontroll-Patient 2	
	vor Behandlungsbeginn	3 Monate nach OP	vor Behandlungsbeginn	3 Monate nach OP
n-Pentan	4,80	37,1	3,20	22,1
n-Hexan	2,60	1,10	0,58	1,01
n-Heptan	3,64	0,74	0,47	0,60
n-Oktan	1,86	0,52	2,29	0,42
n-Nonan	1,93	0,54	5,09	0,45
n-Dodekan	2,81	1,40	5,78	1,83
2-Methylpentan	over	3,45	0,78	2,85
3-Methylpentan	7,18	1,66	0,35	1,41
Cyclohexan	n. e.	n. e.	0,44	2,64
Methylcyclopentan	5,25	1,35	1,45	1,19
Benzen	n. d.	1,75	0,07	1,81
Ethylbenzen	0,45	0,41	0,36	0,39
n-Propylbenzen	0,30	0,11	0,53	0,11
Propanal	40,8	122	n. a.	123
n-Butanal	2,10	n. a.	1,39	0,51
n-Pentanal	1,29	0,28	0,80	0,30
n-Hexanal	3,58	1,40	4,75	1,80
n-Heptanal	0,86	0,15	1,93	n. d.
n-Oktanal	0,96	n. a.	2,67	n. d.
n-Nonanal	6,35	n. d.	9,51	n. d.
n-Dekanal	1,94	n. d.	5,21	n. d.
1-Butanol	5,33	2,56	4,93	2,85
2-Butanon	23,3	9,01	9,81	4,87
2-Pentanon	4,16	1,62	0,89	n. d.

n. a.: nicht auswertbar, n. d.: nicht detektierbar, n. e.: nicht erfassbar, weil die Auswertung mit der quadratischen Regressionsgerade einen fehlerhaften Ergebnis zurückgibt

Vergleich von Atemluftproben in Probenahmeröhrchen (Ergänzung zu Kapitel 4.2.7)

Das Ergebnis des Vergleichs von unbeatmeten Probenahmeröhrchen und Atemluftproben mit dem Mann-Whitney-U-Test (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$) ist in Anhang Tabelle 50 angegeben.

Anhang Tabelle 50: Ergebnisse des Vergleichs der aus den HS-SPME-GC-MS-Chromatogrammen für 18 Zielsubstanzen ermittelten Signalflächen von unbeatmeten Probenahmeröhrchen ($n=12$) mit Atemluftproben von Lungenkrebspatienten ($n=18$) und Gesunden ($n=23$) bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

Substanz	Vergleich von Proben		
	unbeatmet -> Patient	unbeatmet -> Gesunder	Gesunder -> Patient
n-Pentan		↓	↑
n-Hexan		↓	↑
n-Heptan		↓	↑
n-Nonan		↓	↑
n-Dodekan		↓	↑
3-Methylpentan		↓	↑
Cyclohexan		↓	↑
Benzen		↓	↑
Ethylbenzen			↑
n-Propylbenzen			↑
Propanal		↓	↑
n-Butanal		↓	↑
n-Hexanal		↓	↑
n-Heptanal		↓	↑
n-Oktanal		↓	↑
1-Butanol		↓	↑
2-Butanon		↓	↑
2-Pentanon		↓	↑

↓/↑: signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Verhalten der 24 Zielsubstanzen und γ -Butyrolakton in Lungengewebe (Ergänzung zu Kapitel 4.2.7)

Anhang Tabelle 51: Signalfächen / counts für 24 Zielsubstanzen und γ -Butyrolakton ermittelt aus HS-SPME-GC-MS-Chromatogrammen von reseziertem Lungengewebe und von Qualitätskontrollstandardanalysen; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

Patientencode	OP Patient 1				OP Patient 2				OP Patient 3			
	G	T	qm-G	qm-T	G	T	qm-G	qm-T	G	T	qm-G	qm-T
n-Pentan	n. a.	n. a.	2179	2535	n. a.	n. a.	3213	2907	n. a.	n. a.	2805	2859
n-Hexan	15308	6947	11671	12630	8793	5461	10662	10962	3302	2362	11375	13364
n-Heptan	10538	10133	20273	22464	17916	12323	16644	22618	n. a.	2444	21847	24685
n-Oktan	n. a.	n. a.	71122	75364	n. a.	n. a.	74612	71789	n. a.	n. a.	81981	85955
n-Nonan	12285	n. a.	86466	82534	n. a.	n. a.	87330	81731	n. a.	n. a.	102325	95610
n-Dodekan	3362	1760	9476	6321	2696	2439	6964	7228	1825	1404	9252	8444
2-Methylpentan	8986	12197	1410	1660	28429	6842	1732	1576	1422	792	1965	1756
3-Methylpentan	873	764	2047	2447	542	534	2480	2824	1218	498	2678	2447
Cyclohexan	2087	1675	2039	2235	5746	5237	2316	2081	4893	3824	2440	2214
Methylcyclopentan	n. a.	n. a.	2700	3145	n. a.	n. a.	3167	3181	n. a.	n. a.	3346	3110
Benzen	19155	22229	1215452	1218324	19694	16592	1314611	1211447	24193	15219	1348509	1338589
Ethylbenzen	115465	123082	372932	358716	76560	110647	363536	354519	429473	83734	419244	420788
n-Propylbenzen	n. a.	n. a.	75487	67203	n. a.	n. a.	57402	62979	n. a.	n. a.	71773	72129
Propanal	8121	11810	29372	28156	6258	9271	29744	28325	26956	9886	30930	28734
n-Butanal	7608	8427	7441	7256	9512	11320	6747	7147	4727	4112	7322	7286
n-Pentanal	9256	9420	24013	22228	7327	7552	20654	19698	7717	4454	22222	24205
n-Hexanal	23388	19489	9471	8451	14033	15340	7585	7025	12309	4038	7467	8360
n-Heptanal	2252	1182	529	352	1283	1166	492	421	920	370	377	340
n-Oktanal	3193	1336	119	60	1730	1684	121	135	702	272	102	63
n-Nonanal	50487	19888	n. a.	n. a.	25473	24476	n. a.	n. a.	10082	2128	n. a.	n. a.
n-Dekanal	28751	13281	n. a.	n. a.	14108	17142	n. a.	n. a.	2507	n. a.	n. a.	n. a.
1-Butanol	63802	32086	4138	3327	85998	79622	2506	3001	31308	19914	3293	3754
2-Butanol	125661	123929	148026	147180	456995	330549	160052	152091	5090097	379594	166115	161752
2-Pentanol	12859	15184	386779	366150	20066	20407	402731	371097	42027	13467	412516	394883
γ -Butyrolakton (m/z 42 u)	15764	3432	-	-	31566	5917	-	-	14118	2480	-	-

G: unauffälliges Gewebe, T: Tumorgewebe, qm: Qualitätskontrollstandardanalysen, n. a. ... nicht auswertbar (Koelution)

Anhang Tabelle 51 (Fortsetzung): Signalfächen / counts für 24 Zielsubstanzen und γ -Butyrolakton ermittelt aus HS-SPME-GC-MS-Chromatogrammen von reseziertem Lungengewebe und von Qualitätskontrollstandardanalysen; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

Patientencode		OP Patient 4				OP Patient 5			
Probenbezeichnung		G	T	qm-G	qm-T	G	T	qm-G	qm-T
n-Pentan		13428	3923	2918	2517	5692	17723	2845	2668
n-Hexan		13610	23086	10804	11322	4658	5069	11098	10570
n-Heptan		11682	10623	16889	18862	8378	12809	20540	22216
n-Oktan		n. a.	n. a.	83229	67889	n. a.	n. a.	67372	72262
n-Nonan		19711	14034	98599	76178	14650	19038	83051	76198
n-Dodekan		6987	4267	8975	4988	3829	6643	9727	6349
2-Methylpentan		n. a.	52623	1811	1358	6160	7339	1635	1382
3-Methylpentan		n. a.	n. a.	2611	2152	2700	4592	2469	2699
Cyclohexan		2351	3549	2290	1947	17339	19311	2309	2075
Methylcyclopentan		n. a.	n. a.	3266	2829	n. a.	n. a.	3065	2911
Benzen		23427	20491	1352491	1210711	10013	8441	1295068	1313729
Ethylbenzen		20455	20848	423752	355403	8022	6936	386412	434719
n-Propylbenzen		974	n. a.	73263	57916	n. a.	n. a.	62620	76771
Propanal		15581	27283	28165	26036	8558	10163	32636	35040
n-Butanal		16206	17070	6711	6042	n. a.	n. a.	8786	9969
n-Pentanal		17003	16121	21266	19030	15715	19587	28270	36764
n-Hexanal		46847	33945	10549	7154	34485	59187	10150	14190
n-Heptanal		5006	2876	986	368	4004	6664	424	615
n-Oktanal		8087	4395	304	75	5252	10293	88	79
n-Nonanal		135980	104738	n. a.	n. a.	68144	143551	n. a.	n. a.
n-Dekanal		69906	46356	n. a.	n. a.	39593	90150	n. a.	n. a.
1-Butanol		142341	107896	3100	3099	113205	142067	4965	4875
2-Butanol		230712	177851	165969	150684	270547	310544	166397	160151
2-Pentanon		21084	14093	400286	368207	15640	19909	434251	427383
γ -Butyrolakton (m/z 42 u)		31597	5752	-	-	22808	7578	-	-

G: unauffälliges Gewebe, T: Tumorgewebe, qm: Qualitätskontrollstandardanalysen, n. a. ... nicht auswertbar (Koelution)

Anhang Tabelle 52: Vergleich der für 24 Zielsubstanzen und γ -Butyrolakton ermittelten Signalflächen in unauffälligem Gewebe mit Tumorgewebe mit und ohne Korrektur für fünf Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

Substanz	ohne Korrektur ¹					Korrektur mit Einwaage und Vergleichsanalyse ²				
	OP 1	OP 2	OP 3	OP 4	OP 5	OP 1	OP 2	OP 3	OP 4	OP 5
n-Pentan	n. a.	n. a.	n. a.	↓	↑	n. a.	n. a.	n. a.	↓	↑
n-Hexan	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓
n-Heptan	↓	↓	n. a.	↓	↑	↓	↑	n. a.	↑	↓
n-Oktan	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
n-Nonan	n. a.	n. a.	n. a.	↓	↑	n. a.	n. a.	n. a.	↑	↓
n-Dodekan	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓
2-Methylpentan	↑	↓	↓	n. a.	↑	↓	↓	↑	n. a.	↓
3-Methylpentan	↓	↓	↓	n. a.	↑	↓	↑	↑	n. a.	↓
Cyclohexan	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓
Methylcyclopentan	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Benzen	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓
Ethylbenzen	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓
n-Propylbenzen	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	↑	n. a.
Propanal	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓
n-Butanal	↑	↑	↓	↑	n. a.	↓	↑	↑	↑	n. a.
n-Pentanal	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓
n-Hexanal	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
n-Heptanal	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
n-Oktanal	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↓
n-Nonanal	↓	↓	↓	↓	↑	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
n-Dekanal	↓	↑	↑	↓	↑	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
1-Butanol	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓
2-Butanon	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
2-Pentanon	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
γ -Butyrolakton	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	-

↓/↑: Intensität in der Tumorprobe geringer / höher als im unauffälligen Gewebe, n. a.: nicht auswertbar

¹: Vergleich der ermittelten Signalflächen für unauffälliges Gewebe und Tumorgewebe

²: Vergleich der auf Einwaage und Qualitätskontrollstandard bezogenen Signalflächen für unauffälliges Gewebe und Tumorgewebe

Anhang Tabelle 53: Ergebnis der einfachen ANOVA für den Vergleich der Signalintensitäten von γ -Butyrolakton analysiert in unauffälligem Lungengewebe und Tumorgewebe für fünf Patienten mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

Substanz	Prüfgröße	kritischer F-Wert	Auswertung
γ -Butyrolakton	22,2849	5,3177	signifikant unterschiedlich

Qualitative Auswertung der Scan-Chromatogramme der Lungengewebeproben (Ergänzung zu Kapitel 4.2.7)

Die Identifizierung der Signale im Scan-Chromatogramm (Anhang Tabelle 54) erfolgte entweder durch Vergleich der Retentionszeit und des Massenspektrums mit der authentischen Standardsubstanz oder durch Abgleich des Massenspektrums mit der NIST-Datenbank.

Anhang Tabelle 54: Signalidentifizierung in HS-SPME-GC-MS-Chromatogrammen von Lungengewebebeobachten für fünf Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

Signal Retentionszeit/ min	Identifizierung	Patientencode									
		OP Patient 1		OP Patient 2		OP Patient 3		OP Patient 4		OP Patient 5	
		G	T	G	T	G	T	G	T	G	T
5,808	2-Methylbutan	x	x	x	x			x	x		
6,509	Ethanol	x	x	x	x	x	x				
6,630	Perfluorodekansäure	x	x	x	x			x	x	x	x
7,010	Isopren	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7,534	Aceton	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7,852	2-Propanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8,072	Kohlenstoffdisulfid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8,212	Acetonitril	x	x								
8,753	Dichlormethan								x		
8,813	2-Methylpentan			x				x	x		
8,893	t-Butanol	x	x	x	x		x	x	x	x	x
8,914	C ₅ H ₁₀							x			
10,155	n-Hexan	x	x	x					x		
10,396	2-Methyl-2-propenal				x			x	x	x	x
10,576	1-Propanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11,578	n-Butanal							x		x	x
11,618	Trimethylsilanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11,999	2-Butanon	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12,119	Ethylacetat					x	x				
12,439	2-Butanol	x		x	x	x	x	x	x	x	x
13,621	Cyclohexan			x		x	x			x	x
14,062	Hexamethyldisiloxan	x	x	x	x	x	x			x	x
15,224	n-Heptan	x	x	x	x			x	x	x	x
	3-Methyl-2-butanon					x	x				
15,886	1-Butanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16,226	C ₈ H ₁₆	x	x	x	x	x	x		x		
16,727	2-Pentanon	x	x	x		x	x	x	x		
16,968	Methylcyclohexan			x							
17,068	1,2-Dichlorpropan					x	x				
17,108	n-Pentanal	x	x	x				x	x	x	x
17,389	n. i.	x	x					x			
19,292	Dimethyldisulfid	x	x	x	x			x	x	x	
19,533	n. i.	x								x	x
19,713	Pyridin				x					x	
20,134	Fluorotrimethylsilan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21,316	Hexamethylcyclotrisiloxan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21,777	2,4-Dimethylheptan	x		x	x			x	x	x	x
22,579	n-Hexanal	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	n. i.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
23,901	4-Methyloktan	x	x	x	x			x	x		
25,084	Ethylbenzen	x	x	x	x	x	x	x	x		
25,524	Dimethylbenzen	x	x	x	x	x	x	x	x		
25,685	n-Nonan							x	x		
26,818	Dimethylbenzen	x	x	x	x	x	x		x		
27,122	n. i.							x			x
27,391	n. i.							x	x		x
27,684	n-Heptanal	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29,149	Oktamethylcyclotetrasiloxan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29,536	6-Methyl-3-heptanon					x					
29,922	Methoxyphenyloxim	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
30,068	einfach ungesättigter Alkohol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

G: unauffälliges Lungengewebe, T: Tumorgewebe, n. i.: nicht identifizierbar, x: Indikation, dass das Signal in der Probe detektiert wurde

Anhang Tabelle 54 (Fortsetzung): Qualitative Auswertung der HS-SPME-GC-MS-Untersuchung von Lungengewebeproben für fünf Lungenkrebspatienten; Ergänzung zu Kapitel 4.2.7

Signal Retentionszeit/ min	Identifizierung	Patientencode									
		OP Patient 1		OP Patient 2		OP Patient 3		OP Patient 4		OP Patient 5	
		G	T	G	T	G	T	G	T	G	T
30,255	n. i.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
30,375	ein Alkan					x	x	x	x		
30,694	ein Siloxan	x	x	x	x	x	x	x	x		
31,364	γ -Butyrolakton	x		x		x		x		x	
31,681	Benzaldehyd	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
31,848	6-Methyl-5-hepten-2-on	x	x	x	x			x	x	x	x
32,382	ein Alkan					x					
32,632	n-Oktanal	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
33,333	ein Alkan	x	x	x	x			x	x	x	
33,583	n. i.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
33,683	Benzonitril oder Isocyanobenzen	x	x	x	x	x	x	x	x		
34,217	2-Ethyl-1-hexanol	x		x	x	x		x	x	x	x
35,845	n. i.			x				x			
36,556	n. i.	x	x	x	x	x	x	x			
36,854	ein Siloxan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
37,491	n-Nonanal	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
37,673	n. i.							x			
37,987	n. i.						x				
38,524	n. i.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
39,141	n. i.	x	x					x	x	x	x
39,292	n. i.	x	x			x	x	x	x	x	
39,851	n-Dekanal	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
40,328	ein Alkan	x	x	x	x			x	x	x	x
40,573	ein Siloxan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
40,654	n. i.					x	x	x	x		
41,818	ein Siloxan	x	x	x	x	x				x	
42,016	n. i.	x	x	x	x	x	x		x	x	x
42,376	Propofol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
42,760	ein Siloxan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
43,179	Methyldiethyldithiocarbamat	x		x		x				x	
43,936	Di-t-butylhydrochinon	x		x	x	x		x	x	x	x
44,820	ein Siloxan	x	x	x	x	x	x		x	x	

g: unauffälliges Lungengewebe, t: Tumorgewebe, n. i.: nicht identifizierbar, x: Indikation, dass das Signal in der Probe detektiert wurde,

A.6 Zusammenfassung von Probenahme und Analyse der Atemluftproben

Equipment zur Probenahme von Atemluft von Studienteilnehmern und für Blindwerte

In einem PatientenKoffer waren enthalten:

- ein adsorbervliesgefülltes Röhrchen mit roten Vollkappen,
- ein adsorbervliesgefülltes Röhrchen mit roten Kappen mit Apertur und Septen,
- ein Gassammelrohr mit roter Schraubkappe mit Apertur und Silikon/PTFE-Septum,
- ein desinfiziertes, eingeschweißtes Mundstück,
- ein Plastikbehälter für den Rücktransport des verwendeten Mundstückes,
- drei desinfizierte, eingeschweißte Adapter für die Verbindung von Mundstück-Gassammelrohr, Mundstück-Probenahmeröhrchen und Probenahmeröhrchen-Spirometer,
- Etiketten und
- Markierungsklebeypunkte zur Kennzeichnung bereits beatmeter Probenahmekörper.

In einem Koffer für fünf Gesunde (verwendet bis Dezember 2014) befanden sich:

- zehn adsorbervliesgefüllte Röhrchen mit schwarzen Vollkappen,
- fünf desinfizierte, eingeschweißte Mundstücke,
- fünf Plastikbehälter für den Rücktransport der verwendeten Mundstücke,
- fünf desinfizierte, eingeschweißte Adapter für die Verbindung von Mundstück-Probenahmeröhrchen,
- Etiketten und
- Markierungsklebepunkte zur Kennzeichnung bereits beatmeter Probenahmekörper.

In einem Koffer für einen Gesunden (verwendet ab Januar 2015) befanden sich:

- ein adsorbervliesgefülltes Röhrchen mit schwarzen Vollkappen,
- ein adsorbervliesgefülltes Röhrchen mit schwarzen Kappen mit Apertur und Septen
- ein Gassammelrohr mit schwarzer Schraubkappe mit Apertur und Silikon/PTFE-Septum
- ein desinfiziertes, eingeschweißtes Mundstück,
- ein Plastikbehälter für den Rücktransport des verwendeten Mundstückes,,
- sowie zwei desinfizierte, eingeschweißte Adapter für die Verbindung von Mundstück-Gassammelrohr und Mundstück-Probenahmeröhrchen,
- Etiketten und
- Markierungsklebepunkte zur Kennzeichnung bereits beatmeter Probenahmekörper.

Das Equipment für die Blindwertprobenahme in der ELK bestand aus:

- einem Koffer mit einer 1 L-Eichpumpe, der vor Ort in der Klinik verblieb, und
- einem Koffer mit einem gereinigten Gassammelrohr und Markierungsetiketten.

Das Equipment für die Blindwertprobenahme in der BAM bestand aus:

- einer Membranpumpe
- ein Koffer mit einem gereinigten Gassammelrohr und Markierungsetiketten.

Die Codierung für die Etiketten bestand aus vier Ziffern für den Studienteilnehmer sowie einer Ziffer zur Kennzeichnung der einzelnen Probe. Dabei stand 1xxx für die Charité, 5xxx für die ELK und 7xxx für die BAM. x0xx ist für Patienten, x5xx für Gesunde und x9xx für Blindwertproben. Darüber hinaus wurde fortlaufend nummeriert. Das erste Probenahmeröhrchen für das Hundetraining hatte die Nummer xxxx-1, das zweite Probenahmeröhrchen bekommt die xxxx-2 und das Gassammelrohr die xxxx-3. Die Etiketten für die Probenahmeröhrchen wurden einseitig angebracht, so dass auf diese Weise auch gleich die vorgeschriebene Beatmungsseite gekennzeichnet war. Die Probennummern xxxx-4 und die xxxx-5 bezeichneten gesundes Gewebe bzw. Tumorgewebe. Die Nummer xxxx-6 bezeichnete eine Atemluftprobe in einem Gassammelrohr, die drei Monate nach Tumorresektion genommen wurde.

Vorbereitung der Gassammelrohre

Für die Reinigung wurden die Gassammelrohre komplett auseinander gebaut. Anschließend wurde der Glaskörper von innen zunächst mit entionisiertem Wasser und danach mit Methanol gespült. Weiterführend wurde das Gassammelrohr von außen poliert bevor eine Trocknung für mindestens 8 h bei 140 °C erfolgte. Die Teflonhähne wurden in Methanol eingelegt, für 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend über Nacht an der Luft getrocknet.

Nach der Reinigung wurden die Gassammelrohre zusammengebaut. Das laterale Gewinde wurde mit einer Schraubkappe mit Apertur und Silikon/PTFE-Septum verschlossen. Die Gassammelrohre wurden anschließend für 5 min mit ca. 300 mL synthetischer Luft gespült. Beim Beenden des Spülens wurde zuerst der Gasstrom abgestellt und anschließend zügig beide Hähne verschlossen.

Vorbereitung der Probenahmeröhrchen

Die Glasrohre der Probenahmeröhrchen wurden vor dem Befüllen mit Adsorbervliesen im Industrieschirrspüler gereinigt, danach mit Wasser und Methanol gespült und anschließend bei 140 °C für mindestens 8 h getrocknet.

Nach der Reinigung der Glasrohre wurden je ein hydrophiles und ein hydrophobes Polypropylenvliese mit asota[®] olefin Modifikation eingebracht. Die Probenahmeröhrchen mit der Nummer xxxx-1 wurden mit Vollkappen verschlossen. Für die Probenahmeröhrchen xxxx-2 für die VOC-Analyse mit Kappen mit Apertur wurden anfänglich Silikon-Septen eingesetzt. Ab Patient Nr. 1011 und 5032 kamen Silikon/PTFE-Septen zum Einsatz. Atemluftproben in Probenahmeröhrchen von Gesunden, die für die Analyse bestimmt waren, wurden stets mit Silikon/PTFE-Septen ausgerüstet.

Reinigung und Desinfektion von Adaptern, Mundstücken und Aufbewahrungsbehältern

Die Reinigung und Desinfektion von Adaptern, Mundstücken und Aufbewahrungsbehältern erfolgte nach StAA BAM-1.2-ALA-02 (Anhang Seite A-81). Dabei wurde zunächst in einem Tauchbadverfahren mit Bodedex[®] forte als 1 %ige Lösung für 5 min gereinigt und anschließend die Elemente mit Wasser abgespült. Für die Desinfektion erfolgte die Anwendung von Korsolex[®] extra als 4 %ige Lösung im Tauchbadverfahren für 1 h. Nach Desinfektion wurden die Elemente mit Wasser gespült, auf einem Zellstofftuch luftgetrocknet und, ausgenommen die Aufbewahrungsbehälter, in eine Folienhülle mittels eines Folienschweißgerätes eingeschweißt. Danach kamen die eingeschweißten Mundstücke in die verschraubbaren Aufbewahrungsbehälter.

Probenahme von Atemluft im Rahmen der BIOAIR-Studie

Die Atemprobenahme im Rahmen der BIOAIR-Studie erfolgte entsprechend dem entwickelten Probenahmeprotokoll nach der Standardarbeitsanweisung BAM-1.2-ALA-01 (Seite A-78). Dabei wurde ab Januar 2015 das Probenahmeprotokoll für die gesunden Probanden abgewandelt; ab nun erfolgte die Probenahme analog zu den Patienten mit zwei Probenahmeröhrchen und einem Gassammelrohr, jedoch weiterhin ohne Volumenkontrolle mit Spirometer.

Die Probenahme setzte die Aufklärung der Person durch einen Studienarzt und die Einwilligung des Studienteilnehmers voraus. Im Vorfeld der Probenahme durfte für mindestens 30 min keine Nahrung, außer Wasser, aufgenommen werden. Rauchen war gleichermaßen unzulässig. Während der gesamten Probenahme saß der Studienteilnehmer. Als erstes wurden die zwei Probenahmeröhrchen (Nr. xxxx-1 und xxxx-2) beatmet und anschließend das Gassammelrohr (Nr. xxxx-3). Zwischen je zwei Atemproben war eine Pause von mindestens 10 min einzuhalten, in der der Studienteilnehmer sich erholen konnte. Jede Probe wurde mit einem Atemzug beatmet. Dafür atmete der Studienteilnehmer tief ein und durch das an den Probenahmekörper adaptierte Mundstück langsam bis zum Erreichen der expiratorischen Vitalkapazitätsgrenze (maximal) aus. Die Beatmung der Probenahmeröhrchen erfolgte bei den Patienten spirometerkontrolliert, damit beurteilt werden konnte, ob sie ein Atemvolumen von mindestens 1,5 L ausatmen können. Auf diese Kontrolle wurde bei den gesunden Probanden verzichtet, da eine Kapazität von mindestens 1,5 L vorausgesetzt werden konnte.

Die Probenahme der Verlaufskontrollprobe unter Einsatz eines Gassammelrohres drei Monate nach Tumoresektion (Nr. xxxx-6) wurde mit dem gleichen Atemmanöver ausgeführt.

Blindwertprobenahme

Die Blindwertprobenahme an der ELK erfolgte entsprechend des Entwurfs der StAA BAM-1.2-ALA-04 (Seite A-83). Dabei wurde eine manuelle 1 L-Eichpumpe an ein Gassammelrohr adaptiert, der Probenahmekörper beidseitig geöffnet und die Pumpe aufgezogen damit Luft einströmte. Anschließend verschloss man das Gassammelrohr wieder und trennte es von der Pumpe.

Die Blindwertprobenahme an der BAM erfolgte, indem ein Gassammelrohr an eine Membranpumpe adaptiert wurde. Es folgte das beidseitige Öffnen des Probenahmekörpers, das Einschalten der Pumpe für ca. 30 s und damit das Einsaugen der Luft. Nach dem Abstellen der Membranpumpe wurde das Gassammelrohr zügig verschlossen.

Die Blindwertprobenahme erfolgte parallel zur Atemluftprobenahme. Je Probenahmetag und Standort wurde eine Blindwertprobenahme durchgeführt.

Lagerung und Transport der gefüllten Probenahmekoffer

Die gefüllten Probenahmekörper wurden in den Kliniken in den Koffern bei Raumtemperatur bis zur Abholung nach ein bis drei Tagen gelagert. Der Probentransport und Kofferaustausch erfolgte durch die Dienstwagenfahrer der BAM. Nach Ankunft an der BAM wurde das erste Probenahmeröhrchen bei 6 °C in den Kühlschrank eingelagert, während die Analyse der Atemluftproben in dem zweiten Röhrchen und dem Gassammelrohr am Anlieferungstag stattfand. Die Untersuchung der Proben der gesunden Studienteilnehmer aus der BAM erfolgte am Tag nach der Probenahme.

Vorbereitung der Kalibrierung und der Qualitätskontrollstandardproben für die quantitative Analyse der Atemluftproben in Gassammelrohren

Trockene synthetische Luft wurde durch drei Gaswaschflaschen mit Wasser, davon zwei mit Sinterplatten, durchgeleitet. Die angefeuchtete Modellluft strömte in das gereinigte Gassammelrohr ein. Die Spülzeit betrug 30 min.

Für die Kalibrierung erfolgte die Vorbereitung von neun Gassammelrohren. Zu den vorbereiteten Gassammelrohren wurden 10 µL der methanolischen Standardlösungen aus Anhang Tabelle 16 (Seite A-11) gegeben. Es folgte die Equilibrierung der dotierten Gassammelrohre für mindestens 30 min bei Raumtemperatur.

Für die Qualitätskontrolle wurden drei Gassammelrohre mit angefeuchteter Modellluft. Anschließend wurden 10 µL der Standardlösung mit dem Konzentrationsniveau Nr. 2, 6 bzw. 8 aus Anhang Tabelle 16 (Seite A-11) dotiert und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur equilibriert.

Es erfolgte keine Kalibrierung der HS-SPME-GC-MS-Analytik für die Probenahmeröhrchen. Es wurden auch keine Qualitätskontrollproben vorbereitet und analysiert.

HS-SPME-GC-MS-Analytik von Gassammelrohren (Kalibrierung und Untersuchung der Atemluftproben) und Probenahmeröhrchen

Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte der Start einer GC-MS-Analyse ohne Probenaufgabe. Parallel dazu wurde die Car/PDMS-Faser (75 µm) bei 300 °C unter Stickstoffatmosphäre ausgeheizt. Anschließend nahm man ein GC-MS-Chromatogramm der vorbereiteten Faser auf. An die Desorption der SPME-Faser schloss sich die Extraktion im ersten Gassammelrohr an.

Für die Kalibrierung wurden nacheinander die Inhalte der neun vorbereiteten Gassammelrohre mit Standardlösungen in der Reihenfolge aufsteigender Konzentration mit HS-SPME-GC-MS analysiert.

Für die Untersuchung von Proben erfolgte zunächst die Analyse der drei Qualitätskontrollstandardproben gefolgt von den Atemluft- und Blindwertproben in Gassammelrohren. Nach der letzten Atemluftprobe in einem Gassammelrohr wurde die SPME-Faser gewechselt und für 50 min bei 300 °C unter Stickstoffatmosphäre ausgeheizt. Es schloss sich die HS-SPME-GC-MS-Analyse der beatmeten Probenahmeröhrchen unter Einsatz einer Car/PDMS-Faser (75 µm) für 1 h bei Raumtemperatur (23 °C) an. Dabei wurde die SPME-Faser an der mit dem Etikett markierten Seite eingeführt, bei der es sich um die Beatmungsseite handeln sollte. In unregelmäßigen Abständen erfolgte anschließend die Analyse unbeatmeter Probenahmeröhrchen.

Die angewendeten HS-SPME-GC-MS-Parameter, die aus den Methodenoptimierungen und Methoden Anpassungen hervorgegangen waren, sind in Anhang Tabelle 55 zusammengefasst.

Anhang Tabelle 55: Zusammenfassung der HS-SPME-GC-MS-Bedingungen für die quantitative Analyse von Atemluftproben

SPME-Parameter	
Faserbelegung	Car/PDMS 75 µm
Extraktionszeit	1 h
Extraktionstemperatur	Raumtemperatur (23 °C)
GC-Parameter	
Injektion	SPME
Septum	Merlin MicroSeal®
GC Inlet Liner	für SPME, Innendurchmesser 0,75 mm
Injektortemperatur	280 °C
Split	0-3 min splitless, 3-5 min Splitventil offen
Trägergas	Helium 5.0
Gasfluss	1,4 mL·min ⁻¹
Säule	VF-624ms, 60 m x 0,32 mm x 1,8 µm
Ofenprogramm	40 °C, 5 min, 4 °C·min ⁻¹ , 140 °C, 5 min, 20 °C·min ⁻¹ , 260 °C, 4 min
Temperatur Transferline	280 °C
MS-Parameter	
Ionisationsart	EI positiv
Ionisierungsenergie	70 eV
Quellentemperatur	230 °C
Quadrupoltemperatur	150 °C
Detektionsmodus	Scan (m/z 35-300 u)
	SIM gemäß Anhang Tabelle 17 (Seite A-12)

SPME-Fasermanagement

Für die Untersuchungen wurden Car/PDMS-Fasern (75 µm) eingesetzt. Zu Beginn der Studie wurden fünf Packungen mit je drei SPME-Fasern mit derselben Chargennummer bezogen. Die Studienproben wurden ausschließlich mit diesen Fasern untersucht. Dabei erfolgte eine Unterscheidung zwischen Fasern zur Untersuchung der Gassammelrohre und der Probenahmeröhrchen.

Neue Fasern wurden gemäß Herstellerangaben konditioniert und anschließend kalibriert. Nachdem die Analysen eines Arbeitstages mit einer Faser beendet waren, folgte die Lagerung in verschließbaren Glasröhrchen mit eingelegtem Silikon/PTFE-Septum.

Die Fasern für die Analyse der Gassammelrohre wurden für 100-110 Injektionen verwendet. Anschließend erfolgte der Tausch mit einer neuen SPME-Faser. Die Kalibrierung wurde für neue Fasern nach ca. 50 Injektionen zur Überprüfung wiederholt. Demgegenüber erfolgte die Extraktion aller Atemluftproben in Probenahmeröhrchen mit einer einzigen Faser.

Ermittlung der VOC-Gehalte in den Atemluftproben in Gassammelrohren

Für die Auswertung wurde für jede Substanz die Signalfläche im EIC für das Target-m/z ausgehend von den SIM-Daten bestimmt. Für die Identifizierung erfolgte die Betrachtung des Verhältnisses Qualifier-m/z zu Target-m/z sowie der Peakform. Im Zweifelsfall (Target-m/z in Ordnung, aber Qualifier-m/z durch Koelution mit Matrixbestandteilen beeinflusst) konnte im Scan-Modus ein Abgleich des Massenspektrums mit dem der authentischen Substanz vorgenommen werden.

Die Kalibrierung wurde als Einfachbestimmung durchgeführt, um die Anwendbarkeit der quadratischen Regression zu prüfen. Sie diente nicht der Auswertung der Analysendaten der Proben.

Die quantitative Auswertung der Analysen der Atemluftproben und die Abschätzung für die Blindwertproben basierte auf den Qualitätskontrollproben. Dafür erfolgte die Neuberechnung der quadratischen Regressionsfunktionen auf Basis der für die Qualitätskontrollproben ermittelten Signalflächen. Anschließend wurde die substanzspezifische Kalibrierfunktion auf die für die Substanz im Chromatogramm der Probe ermittelte Signalfläche angewendet, um den Gehalt in der Probe zu berechnen.

Für die Datenauswertung kam folgendes Vorgehen zum Einsatz: Werte unterhalb der Nachweisgrenze waren nicht detektierbar („n. d.“). Gehalte über der Nachweis- aber unter der Bestimmungsgrenze wurden mit ihrem Zahlenwert in die Auswertung integriert. Gehalte über dem Kalibrierbereich gingen ebenso mit dem errechneten Zahlenwert in die Auswertung ein. Durch die Anwendung eines quadratischen Regressionsmodells für die Quantifizierung kam es in seltenen Fällen für einzelne Analyten vor, dass bei der Auswertung ein fehlerhaftes Ergebnis erhalten wurde. In diesen Fällen lagen die ermittelten Signalintensitäten deutlich außerhalb des Kalibrierbereiches; aufgrund des eingeschränkten Wertebereiches von quadratischen Funktionen, ist diesen y-Werten (Signalfläche) kein x-Wert (Gehalt) zugeordnet. Diese Daten wurden als nicht erfassbar („n. e.“) bezeichnet.

A.7 Standardarbeitsanweisungen und Erhebungsbögen

StAA 1: BAM-1.2-ALA-01

BAM-1.2-ALA-01

Seite 2 (5)

16.04.2014

5. Durchführung

5.1. Atemluft-Probenahme bei Patienten mit der Diagnose Lungenkrebs

Der Probenkoffer für Patienten enthält zwei Doppelgewinderöhrchen aus Glas (im Folgenden als Probenahmeröhrchen bezeichnet) mit roten Schraubkappen, die mit einem weißen Adsorptionsvlies gefüllt sind.

Darüber hinaus befindet sich ein größerer 1-Liter-Glasbehälter, eine sogenannte Gasmaus, mit zwei Hähnen und Gewinde und einem mittleren Gewindeauslass mit Schraubkappe im Probenkoffer.

Der Kofferinhalt wird zusätzlich ergänzt durch zwei eingeschweißte Adapter für die Probenahmeröhrchen und ein eingeschweißtes Adapter für die Gasmaus sowie ein eingeschweißtes, im Behälter befindliches Mundstück, das sowohl für die Probenahmeröhrchen als auch für die Gasmaus eingesetzt wird.

Sowohl der Koffer als auch die Probenahmeröhrchen und die Gasmaus sind mit klinikspezifischen Codenummern versehen. Im Falle des Patienten Nr. 5001 wären das z.B. die Codierungen 5001-1, 5001-2 für die zwei Probenahmeröhrchen und 5001-3 für die Gasmaus.

Die mit Adaptern versehenen Probenahmeröhrchen werden auf dem einen Ende in den Spirometereingang aufgesetzt, während das andere Ende mit einem Mundstück versehen wird. Dabei ist darauf zu achten, dass der Adapter mit dem Mundstück stets auf dem Ende des Röhrchens aufgeschraubt wird, am dem sich die Codenummer befindet.



Abb. 3: Probenahmeröhrchen mit Mundstück und Adapter



Abb. 4: Probenahmeröhrchen mit Mundstück, Adapter und Spirometer

Nach der Vorbereitung des Patienten (Informationsgespräch, Einverständniserklärung) werden von dem ersten Probenahmeröhrchen (z.B. 5001-1) beide Schraubkappen entfernt und mit Adaptern versehen. Dabei ist darauf zu achten, dass der Adapter für das Mundstück auf die Seite des Röhrchens geschraubt wird, wo sich das Etikett befindet (s. Abb. 3).

Der zweite Adapter wird auf das andere Ende des Probenahmeröhrchens geschraubt und an das messbereite Spirometer angeschlossen (s. Abb. 4).

Nun sollte der Patient einmal langsam durch das Mundstück pusten, bis seine expiratorische Vitalkapazitätsgrenze erreicht ist.

Bemerkung: Heftiges Pusten könnte ggf. zu einem Verschieben des Vlieses führen, da diese nicht fest fixiert sind. Andererseits ist der spürbare Gegendruck des Vlieses bei langsamerem Pusten geringer und damit angenehmer.

Das am Spirometer abzulesende Volumen für das erste Probenahmeröhrchen (z.B. 5001-1) wird in den Erhebungsbogen „Patient“ eingetragen.

BAM Qualitätsmanagement-Handbuch		Schriftstück-Nr. BAM-1.2-ALA-01
Gesamt-Seitenanzahl: 5	Seite 1	Datum: 16. April 2014
Anlagen-Anzahl: 0		1. Fassung

Standardarbeitsanweisung

Durchführung der Probenahme von Atemluft für Patienten und für gesunde Probanden in den Kliniken

Anwendungsbereich:

In der Standardarbeitsanweisung wird ein Verfahren beschrieben, mit dem eine reproduzierbare Probenahme von Atemluft von Patienten und gesunden Probanden in den Kliniken erfolgen soll.

1. Verfahren

Für die Probenahme in den Kliniken existiert ein spezielles Probenahme-Equipment, das aus zwei unterschiedlichen Probenkoffern für Patienten und gesunde Probanden (im Folgenden nur als Proband bezeichnet) besteht.

In den Koffern befinden sich Probenahmeröhrchen mit den entsprechenden Adaptern und wiederverwendbaren Mundstücken. Der Patientenkoffer enthält zusätzlich eine Gasmaus und einen weiteren Adapter. Sowohl die Koffer als auch alle Probenahmeröhrchen sind mit klinikspezifischen Codenummern versehen. Dem Inhalt entsprechende Codenummern werden auf Reserveetiketten zur Verwendung für klinische Dokumente mitgeliefert. Im Koffer befindet sich ebenfalls eine Kurzanleitung für den Ablauf der Probenahme und grüne Aufkleber zur Kennzeichnung der Probenahmeröhrchen und der Koffer nach erfolgter Probenahme. Ein Spirometer wird benötigt, um das Volumen der durch die Probenahmeröhrchen geflossenen Luft bei der einmaligen Ausatmung ermitteln zu können.

2. Mindest-Qualitätsanforderungen an das Personal

Die Probenahme darf nur von Personal durchgeführt werden, das über die erforderlichen Sachkenntnisse verfügt.

3. Raumzuordnung

Die Probenahme erfolgt in speziell dafür vorgesehenen Räumen in den Kliniken Charité und Evangelische Lungenklinik.



Abb. 1: Probenkoffer für Patienten und Probanden

4. Verwendete Geräte und Hilfsmittel

- Probenkoffer „Patient“ mit zwei Probenahmeröhrchen, einer Gasmaus, 3 Adaptern und einem im Behälter verpackten Mundstück
- Probenkoffer „Proband“ mit 10 Probenahmeröhrchen, 10 Adaptern und 5 in Behältern verpackten Mundstücken
- Spirometer
- Schutzhandschuhe

Verfasser: I. Nehls	QM-Vermerk:	Freigabe durch: Dr. med. G. Lippert
Tel.: 030 8104-1173	Datum: 20.11.2014	Datum: 20.11.2014

StAA 1 (Fortsetzung): BAM-1.2-ALA-01

BAM-1.2-ALA-01

Seite 4 (5)

16.04.2014

Bei der Verwendung der Probennehmeröhrchen ist darauf zu achten, dass das **Mundstück** immer an dem **Ende** des Röhrchens aufgesteckt wird, an der sich die **Codierungsnummer** befindet (s. Abb. 7).

Die Messung des Volumens mit Hilfe eines Spirometers entfällt für die Probanden, da die Proben nur für qualitative Vergleiche und für das Hundetraining bzw. Tests eingesetzt werden.

Nach Vorbereitung des Probanden (Informationsgespräch, Einverständniserklärung) werden von dem ersten Probennehmeröhrchen (z.B. 5501-1) beide Schraubkappen entfernt. Der **Adapter für das Mundstück** wird auf das Ende des Röhrchens geschraubt, wo sich das **Etikett** befindet. Das andere Ende bleibt offen. Eine Volumenmessung mit Spirometer erfolgt hier nicht.

Nun pustet der Proband **einmal langsam** durch das Röhrchen, bis seine expiratorische Vitalkapazitätsgrenze erreicht ist.

Danach wird der Adapter mit dem Mundstück entfernt, das Röhrchen mit den Schraubkappen an beiden Enden verschlossen und mit einem **grünen Aufkleber** markiert und in den Koffer zurückgelegt.

Die **Wartezeit** zwischen den Probenahmen der beiden Röhrchen beträgt mindestens **10 Minuten**.

Dann wird das zweite Röhrchen (z.B. 5501-2) aus dem Koffer entnommen, wieder beide Schraubkappen entfernt und der **Adapter mit Mundstück** auf das Ende des Röhrchens geschraubt, wo sich das **Etikett** befindet.

Der Proband pustet **einmal langsam** durch das Röhrchen, bis die expiratorische Vitalkapazitätsgrenze erreicht ist. Danach wird der Adapter mit Mundstück entfernt, das Röhrchen mit den Schraubkappen an beiden Enden geschlossen und mit einem **grünen Aufkleber** markiert.

Der Adapter und das Mundstück werden in den Koffer zurückgelegt. Das Mundstück wird dabei zuvor in den Behälter gegeben, um zu vermeiden, dass anhaftender Speichel in das Kofferrinnere gerät.

Bevor auch der Koffer mit einem grünen Aufkleber versehen werden kann, muss die Probenahme für alle fünf Probanden abgeschlossen sein.

5. Codierung

Die Codierung der Proben und die Beschriftung erfolgt klinikspezifisch.

Dabei beginnen die Proben in der Charité mit der Zahl **1000**, wobei die Serien 1001 bis 1499 für Patienten und 1501 bis 1999 für Probanden gelten.

In der **Evangelischen Lungenklinik** beginnt die Zählung mit der Zahl **5000**. Die Patienten erhalten die Codierung 5001 bis 5499 und für die Probanden sind die Zahlen 5501 bis 5999 reserviert.

Sowohl die Probenahmegefäße der Patienten als auch die der Probanden werden in der BAM mit den entsprechenden Etiketten versehen. Zusätzliche Etiketten für die in der Klinik geführten Unterlagen werden in den Koffern mitgeliefert.

7. Protokollierung und Dokumentation

Alle Tätigkeiten im Zusammenhang mit der Probenahme sowie den Informationsgesprächen und den Einverständniserklärungen werden dokumentiert.

Patienten- und Probandendaten werden zunächst in einen Erhebungsbogen und dann in eine Datenbank eingetragen.

Der Verbleib und die Verwendung der Proben wird ebenfalls dokumentiert.

BAM-1.2-ALA-01

Seite 3 (5)

16.04.2014

Beide Adapter werden entfernt und durch die roten Schraubkappen ersetzt. Zur Kennzeichnung der erfolgten Probenahme wird das Röhrchen mit einem **grünen Aufkleber** versehen.

Nach einer **Wartezeit** von mindestens **10 Minuten** erfolgt in analoger Weise die Bestimmung des zweiten Probennehmeröhrchens (z.B. 5001-2) mit Registrierung des Volumens.

Beide Schraubkappen werden entfernt und das bereits benutzte Mundstück (evtl. Abwischen mit Klintex) mit Adapter wird an das Ende des Röhrchens geschraubt, an dem sich das Etikett befindet. Der zweite Adapter wird auf das andere Ende des Röhrchens geschraubt und an das Spirometer angeschlossen. Nach **einmaligem** Durchpusten und Registrieren des Volumens können die Adapter entfernt werden und nach Aufschrauben der roten Schraubkappen wird ebenfalls ein **grüner Kreis** auf das Röhrchen geklebt.



Abb 5: Gasmaus mit Mundstück und Adapter

Nach einer erneuten **Wartezeit** von **10 Minuten** kann nun die Gasmaus (z.B. 5001-3) beatmet werden.

Dazu wird das bereits benutzte Mundstück auf den dazugehörigen Adapter gesteckt und dieser auf einen der seitlichen Gewindeeinlass geschraubt (s. Abb. 5).

Beide Hähne müssen geöffnet werden, damit die in der Gasmaus befindliche Luft verdrängt werden kann.

Auch hier sollte **einmal langsam** gepustet werden, damit es nicht zu starken „Turbulenzen“ in der Gasmaus kommt.

Eine Messung mittels **Spirometer** ist hier **nicht notwendig**.

da das Volumen mit dem Inhalt der Gasmaus von einem Liter vorgegeben ist.

Nach Ende der Beatmung werden die Hähne **zügig** geschlossen, der Adapter entfernt und durch die Schraubkappe ersetzt. Auch hier erfolgt die Kennzeichnung der durchgeführten Probenahme mittels eines **grünen Aufklebers**.

Alle drei Probenahmegefäße, die Adapter und das Mundstück werden in den Koffer zurückgelegt. Dabei wird das Mundstück in den Behälter gegeben, damit anhaftender Speichel nicht direkt mit dem Kofferrinnern in Berührung kommt.

Der Koffer wird geschlossen und erhält von außen ebenfalls einen **grünen Aufkleber**.

Damit ist der Probenahmevergung für einen Patienten abgeschlossen.

5.2 Atemluft-Probenahme bei gesunden Probanden

Der **Probenkoffer für Probanden** enthält zehn Doppelgewinderöhrchen aus Glas (Probennehmeröhrchen) mit schwarzen Schraubkappen, die mit weißem Adsorptionsvlies gefüllt sind. Darüber hinaus befinden sich im Koffer fünf eingeschweißte Adapter für die Probennehmeröhrchen und fünf in Behältern verpackte, eingeschweißte Mundstücke, die für die Probennehmeröhrchen eingesetzt werden (s. Abb.6).

Die Codierung ist wiederum klinikspezifisch. So waren z.B. für den Probanden mit der Nr. **5501** die Nummerierungen auf den Probennehmeröhrchen **5501-1** und **5501-2**.

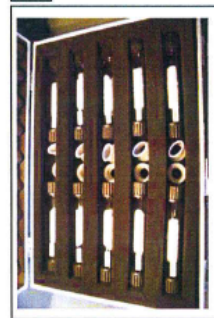


Abb 6: Probenkoffer für Probanden mit 10 Probennehmeröhrchen, 5 Adaptern und 5 Mundstücken



Abb 7: Probennehmeröhrchen mit Mundstück und Adapter

StAA 1 (Fortsetzung): BAM-1.2-ALA-01

BAM-1.2-ALA-01

Seite 5 (5)

16.04.2014

Die für die Analytik und das Hundetraining verwendeten Proben werden in einer gesonderten Datenbank aufgelistet. Hier werden Eingang, Behandlung, Ergebnisse und Entsorgung dokumentiert.

Die Proben, die für das Hundetraining vorgesehen sind, werden den Hundetrainern übergeben. Diese erhalten eine entsprechende Schutzunterweisung und müssen den Erhalt jeder Probe durch Unterschrift dokumentieren. Da die Proben zwischen den Trainingszeiten im Kühlschrank gelagert werden, kann von einer Haltbarkeitsdauer von 90 Tagen ausgegangen werden. Alle Tätigkeiten im Zusammenhang mit den Proben werden in Trainingsbüchern dokumentiert.

Nach Ablauf der Haltbarkeitsfrist sind die Proben an die BAM zu übergeben und dort als kontaminierte Betriebsmittel zu entsorgen.

8. Gesundheits- und Sicherheitsmaßnahmen

Während der Arbeiten sind Schutzkleidung (Kittel) und Schutzhandschuhe (Nitril- oder Butylkautschuk) zu tragen.

9. Entsorgung

Die Entsorgung der Proben geschieht ausnahmslos in der BAM.

Die Proben für die Analytik werden nach Verwendung sachgerecht entsorgt.

Die Gasmaus wird nach Entnahme der Atemluft gereinigt und bei 140°C ausgeheizt.

Das Vlies aus den Glasröhrchen wird nach der Analytik und nach Einsatz im Hundetraining als kontaminierte Betriebsmittel entsorgt. Die Glasröhrchen werden gereinigt und bei 140°C ausgeheizt.

StAA 2: BAM-1.2-ALA-02

BAM-1.2-ALA-02

Seite 2 (4)

10.03.2014

4. Verwendete Substanzen und Geräte/ Hilfsmittel

4.1. Chemikalien

Desinfektionslösung: Kosolex® extra (Sicherheitsdatenblatt s. Anlage 2)

Reinigungslösung: Bodedex® forte (Sicherheitsdatenblatt s. Anlage 3)

Beide Chemikalien sind kommerziell erhältlich bei der Firma Bode Chemie Hamburg.

4.2. Geräte/Hilfsmittel

Folgende Geräte und Hilfsmittel werden eingesetzt:

- Edelstahlwanne mit Deckel für Desinfektionslösung
- Becherglas 1L für Reinigungslösung
- Messzylinder (5 mL, 10 mL, 100 mL, 1000 mL)
- Glasstab
- Edelstahlpinzette
- Zellstofftuch
- Kurzzeitwecker
- Schutzhandschuhe

Nach Desinfektion und Trocknung: - Folienschweißgerät
- Folienschlauch

5. Durchführung

5.1. Herstellung der Reinigungs- und Desinfektionslösung

Auszug aus „Manuelle Instrumentenreinigung mit Kosolex® extra“ (s. Anlage 4)

„Tauchbadverfahren“

Kosolex® extra wird als Konzentrat geliefert und ist gemäß den Dosierungsempfehlungen mit den entsprechenden Einwirkzeiten (s. Dosiertabelle) einzusetzen.

Zum Schutz des Personals müssen alle Instrumente unmittelbar nach ihrem Einsatz sowie wie möglich in Einzelteile zerlegt bzw. geöffnet und in eine Reinigungslösung (Bodedex® forte) eingelegt werden. Bei der anschließenden Desinfektion müssen sämtliche zu desinfizierenden Oberflächen bzw. Hohlräume vollständig mit der Kosolex® extra-Lösung benetzt sein. Nach der Desinfektion erfolgt das gründliche Abspülen und Trocknen der Instrumente.“

Die Reinigung der Mundstücke erfolgt mit Bodedex® forte als 1% ige Lösung für 5 Minuten in einem Tauchbadverfahren.

Nach der Reinigung werden die Mundstücke mit Wasser von mindestens Trinkwasserqualität abgespült und in das Desinfektionsbad gegeben.

Die Dosierung der Desinfektionslösung erfolgt nach der in der Beschreibung für „Manuelle Instrumentenreinigung mit Kosolex® extra“ angegebenen Konzentration und Zeit.

Mit einer 4% igen Lösung und einer Desinfektionszeit von einer Stunde wird eine Desinfektionsleistung, wie für Semikritische Medizinprodukte gefordert, erreicht.

Dosierung

Körner	5 Min.	15 Min.	30 Min.	1 Std.	2 Std.
Bakterizid/Leurocid			1,0 %	0,75 %	0,5 %
Fungizid			4,0 %	3,0 %	2,0 %
Tuberkulizid			3,0 %	2,5 %	1,5 %
Mycobactericid			4,0 %	2,5 %	1,5 %
Breitspektrumcid			1,0 %		
Viruzid			3,0 %	1,0 %	3,0 %
Adenovirus			4,0 %	2,5 %	
HAV			3,0 %	2,0 %	1,0 %
Poliovirus			1,0 %		
Rotavirus					

Tabelle 1: Dosiertabelle für den Einsatz von Kosolex® extra

Veränderung an: Bomedex forte

BAM Qualitätsmanagement-Handbuch		Schriftstück-Nr. BAM-1.2-ALA-02
Gesamt-Seitenanzahl: 4	Seite 1	Datum: 10. März 2014
Anlagen-Anzahl: 4		1. Fassung

Standardarbeitsanweisung

Desinfektion der für die Probenahme von Atemluft benötigten Mundstücke und der entsprechenden Aufbewahrungsbehälter sowie der Adapter

Anwendungsbereich:

In der Standardarbeitsanweisung wird ein Verfahren beschrieben, mit dem wiederverwendbare Mundstücke (A571) des Herstellers „air SAFETY LIMITED“ in Morecambe, U.K., Vertrieb über GANSHORN Deutschland, desinfiziert werden, um für die Atemluftprobenahme von Patienten und gesunden Probanden eingesetzt zu werden.

1. Verfahren

Die Mundstücke sind als Medizinprodukt mit Kontakt zu Schleimhäuten der Klasse „Semikritisch“ ohne besondere Anforderungen an die Aufbereitung“ zuzuordnen. Hierfür ist eine Desinfektion (Wirkungsbereich: bakterizid, einschließlich Mykobakterien, fungizid und viruzid) nach vorangegangener Reinigung vorzusehen.

Die Mundstücke werden vor der Verwendung mit einem von GANSHORN vorgegebenen Verfahren (s. Anlage 1) gereinigt und desinfiziert.

Nach Desinfektion werden die Mundstücke mit Wasser (mindestens Trinkwasserqualität) gespült, auf einem Zellstofftuch luftgetrocknet und in eine Folienhülle mittels eines Folienschweißgerätes eingeschweißt. Danach kommen die Mundstücke in verschraubbare Aufbewahrungsbehälter, die in die entsprechenden Probenahmeboxen (s. StAA BAM-1.2-ALA-01) gegeben werden.

2. Mindest-Qualitätsanforderungen an das Personal

Die Reinigung und Desinfektion darf nur von Personal durchgeführt werden, das über die erforderlichen Sachkenntnisse verfügt.

3. Raumzuordnung

Die Desinfektion der Mundstücke erfolgt im **Ärztraum** (Unfall-Hilfsstelle) des BAM-Hauptgebäudes in Berlin-Adlershof im Haus 8.15, Raum 128.

Eine entsprechende Genehmigung der Amtsärztin und des Sicherheitsingenieurs zur zeitweisen Benutzung des Raumes liegen vor.

Verfasser: I. Neils	QM-Vermerk	Freigabe durch
Teil: 0308104-1173	Datum:	Datum:

BAM-1.2-ALA-02

Seite 3 (4)

10.03.2014

Sowohl für die Reinigungs- als auch für die Desinfektionslösung werden jeweils 1 Liter angesetzt.

Dazu werden 10 mL der **Reinigungslösung** in ein Becherglas gegeben und auf 1000 mL mit Wasser (Trinkwasser) aufgefüllt. Die Lösung ist nach Gebrauch zu entsorgen.

Für die **Desinfektionslösung** werden 40 mL des Konzentrates in ein Becherglas gegeben und mit Wasser (Trinkwasser) auf 1000 mL aufgefüllt. Die Lösung ist bei Raumtemperatur 7 Tage verwendbar, sofern keine Veränderungen (Trübung o.ä.) auftreten.

5.2. Durchführung

Die folgende Beschreibung der Reinigung und Desinfektion gilt auch für neue unbenutzte Mundstücke.

Nach erfolgter Atemluft-Probenahme in den Kliniken werden die verwendeten Mundstücke in die entsprechenden Aufbewahrungsbehälter gegeben und gelangen mit den Proben im Probenkoffer zur BAM. Hier werden die Behälter geöffnet, wobei das Tragen von Schutzhandschuhen Pflicht ist.

Sowohl die Aufbewahrungsbehälter als auch die Mundstücke werden für 5 Minuten in ein Tauchbad mit 1% iger Reinigungslösung Bodedex® forte gegeben, danach werden sie mit Wasser (Trinkwasser) abgespült und anschließend desinfiziert.



Aufbewahrungsbehälter und Mundstücke



Desinfektion der Mundstücke

Die Aufbewahrungsbehälter und die Mundstücke kommen nach der Reinigung für eine Stunde in die 4% ige Desinfektionslösung Korsalex® extra, die sich in einem Edelstahlbehälter mit Deckel befindet.

Nach der Einwirkzeit werden die Aufbewahrungsbehälter und Mundstücke mit Wasser (Trinkwasser) abgespült und auf einem Zellstofftuch getrocknet.



Einschweißen der Mundstücke und Ablage in den Probenkoffer

BAM-1.2-ALA-02

Seite 4 (4)

10.03.2014

Da auch die verwendeten Adapter zwischen Mundstück und Probennehmerhohrchen bzw. zwischen Mundstück und Gasmaus teilweise mit der Atemluft in Berührung kommen, werden auch diese nach Gebrauch gereinigt, desinfiziert und ebenfalls eingeschweißt.

6. Protokollierung und Dokumentation

Alle Tätigkeiten im Zusammenhang mit der Reinigung und Desinfizierung der Mundstücke sowie Bemerkungen werden in einem Laborbuch eingetragen und regelmäßig in eine Informationstabelle zum Verbleib der Probenkoffer und aller Materialien übertragen.

7. Gesundheits- und Sicherheitsmaßnahmen

Während der Arbeiten sind Schutzkleidung (Kittel), Schutzbrille und Schutzhandschuhe (Nitril- oder Butylkautschuk) zu tragen.

Es sind die Sicherheitsdatenblätter der Reinigungslösung Bodedex® forte und der Desinfektionslösung Korsalex® extra zu beachten (s. Anlagen 2 und 3).

Reinigungs-bzw. Desinfektionskonzentrat	R- Sätze	S- Sätze
Bodedex® forte	22, 36/38, 41, 50	26, 37/39
Korsalex® extra	10, 20/22, 37/38, 41, 42/43, 50	23, 24, 26, 37/39, 45, 61

8. Entsorgung

Die Konzentrate der Reinigungslösung Bodedex® forte und der Desinfektionslösung Korsalex® extra dürfen nicht zusammen mit dem Hausmüll entsorgt werden.

Beide Konzentrate dürfen nicht in die Kanalisation gelangen. Zu entsorgende Konzentrate müssen unter Beachtung behördlicher Vorschriften einer Sonderbehandlung zugeführt werden.

Die Entsorgung der verwendeten Verdünnungen als 1% ige Reinigungslösung und 4% ige Desinfektionslösung kann über die Kanalisation erfolgen.

StAA 3: BAM-1.2-ALA-04

BAM-1.2-ALA-xx

Seite 2 (3)

22.05.2015

BAM Qualitätsmanagement-Handbuch	Schriftstück-Nr. BAM-1.2-ALA-04
Gesamt-Seitenanzahl: 3 Anlagen-Anzahl: 0	Datum: 22. Januar 2015 Entwurf

Standardarbeitsanweisung

Durchführung der Probenahme des Blindwerts begleitend zur Atemluftprobenahme von Patienten in den Kliniken

Anwendungsbereich:

In der Standardarbeitsanweisung wird ein Verfahren beschrieben, mit dem eine reproduzierbare Blindwertprobenahme in den Kliniken begleitend zur Atemluftprobenahme von Patienten erfolgen soll.

1. Verfahren

Für die Blindwertprobenahme in den Kliniken existiert ein spezielles Probenahme-Equipment, das aus zwei verschiedenen Koffern besteht.

In dem Koffer „Pumpe“ befindet sich eine 1 L-Eichpumpe für den manuellen Gebrauch mit einem Teflon-Adapter passend für GL14-Gewinde. In dem Koffer „Blindwert“ befindet sich eine Gasmaus. Der Blindwertkoffer und die enthaltene Gasmaus sind mit klinikspezifischen Codenummern versehen. Im Koffer befinden sich grüne Aufkleber zur Kennzeichnung der Gasmaus und der Koffer nach erfolgter Probenahme.

2. Mindest-Qualitätsanforderungen an das Personal

Die Probenahme darf nur von Personal durchgeführt werden, das über die erforderlichen Sachkenntnisse verfügt.

3. Raumzuordnung

Die Probenahme erfolgt in speziell dafür vorgesehenen Räumen in den Kliniken Charité und Evangelische Lungenklinik.

4. Verwendete Geräte und Hilfsmittel

- Probenkoffer „Blindwert“ mit einer Gasmaus
- Koffer „Pumpe“ mit 1 L-Eichpumpe und Adapter

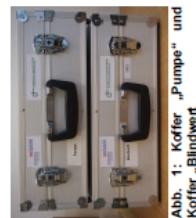


Abb. 1: Koffer „Pumpe“ und Koffer „Blindwert“

5. Durchführung

Die Blindwertprobenahme erfolgt einmal arbeitstäglich im Zusammenhang mit der Atemluftprobenahme beim ersten Patienten des Tages nach StAA BAM-1.2-ALA-01 Punkt 5.1 zeitnah zur Beatmung der Gasmaus mit der Proben-Nr. xxxx-3.

Für die Blindwertprobenahme wird aus dem Koffer „Blindwert“ die Gasmaus entnommen und der Adapter aus dem Koffer „Pumpe“ seitlich an eines der beiden Gewinde der Gasmaus angeschraubt. Anschließend wird die Eichpumpe aus dem Koffer „Pumpe“ mit eingezogenem

Verfasser: K. Schallschmidt	QM-Vermerk	Freigabe durch
Tel.: 030 8104-5533	Datum:	Datum:

BAM-1.2-ALA-xx

Seite 2 (3)

22.05.2015

Stempel auf den Adapter vorsichtig aufgesetzt. Es ist zweckmäßig, die ganze Konstruktion auf eine gerade Fläche aufzulegen und gegebenenfalls die Gasmaus abzustützen, da die Verbindung zwischen Eichpumpe und Gasmaus starr und zerbrechlich ist.



Abb. 2: Inhalt von Koffer „Pumpe“ (links) und Koffer „Blindwert“ (rechts)

Für die Blindwertprobenahme werden beide Hähne der Gasmaus geöffnet und anschließend der Stempel der Eichpumpe langsam bis zum Maximum herausgezogen.



Abb. 3: Adapterung von Gasmaus und Eichpumpe (links). Öffnen beider Hähne der Gasmaus für die Blindwertprobenahme (mitte). Herausziehen des Stempels (rechts)

Danach werden die beiden Hähne der Gasmaus verschlossen. Die Eichpumpe wird vorsichtig vom Adapter gelöst und danach wird der Adapter von der Gasmaus abgeschraubt. Die Gasmaus wird mit einem grünen Kreis beklebt, in den Koffer „Blindwert“ zurück gelegt, der Koffer verschlossen und dieser ebenfalls mit einem grünen Aufkleber versehen. Der Stempel der Eichpumpe wird wieder eingezogen, Eichpumpe und Adapter werden in den Koffer „Pumpe“ zurück gelegt und der Koffer wird verschlossen.

Damit ist die Blindwertprobenahme abgeschlossen. Der gefüllte Koffer „Blindwert“ wird beim nächsten Kofferaustausch (zusammen mit den gefüllten Probenahme-Koffern) gegen einen leeren Koffer „Blindwert“ ausgetauscht; der Koffer „Pumpe“ verbleibt an der Klinik.

6. Codierung

Die Codierung der Blindwertproben und die Beschriftung erfolgt klinikspezifisch. Sowohl die Probenahmegefäße der Patienten als auch die der Probanden werden in der BAM mit den entsprechenden Etiketten versehen.

Dabei beginnen die Proben in der Charité mit der Zahl 1901 und die Proben in der Evangelischen Lungenklinik mit der Zahl 5901.

7. Protokollierung und Dokumentation

Der Verbleib und die Verwendung der Proben werden dokumentiert.

StAA 3 (Fortsetzung): BAM-1.2-ALA-04

BAM-1.2-ALA-xx	Seite 3 (3)	22.05.2015
<hr/>		
8. <u>Gesundheits- und Sicherheitsmaßnahmen</u>		
Während der Arbeiten sind Schutzkleidung (Kittel) und Schutzhandschuhe (Nitril- oder Butylkautschuk) zu tragen.		
9. <u>Entsorgung</u>		
Die Entsorgung der Proben geschieht ausnahmslos in der BAM.		
Die Gasmaus wird nach Entnahme der Luft gereinigt und bei 140°C ausgeheizt.		

CHARITÉ
Chirurgisches Regiozentrum Berlin | CRZ

Evangelische Lungenklinik Berlin
Ein Informations- und Patientenzentrum der Paul Gerhardt Akademie

BAM
Bundesanstalt für
Arbeitsmedizin
und -prüfung

Erhebungsbogen BIOAIR-Studie Patient

Patient (kl. Patientenetikett)

Patientencode (siehe Koffer)

Visite 1 - prä-operativ (während Diagnostik)

Die Probenahme muss vor jeglicher Intervention stattfinden.
Keine Medikamente (außer bisherige Medikation)

Datum der Probenahme: Visite durchgeführt durch (Kurznel):

Alter des Patienten: Geschlecht:

Größe in cm: Gewicht in kg:

Rauchverhalten

Rauchen beendet seit (MM.JJJJ):

Packyears:

Was haben Sie geraucht?
Wichtig: nur 1 bis 3 Antworten

Zigaretten

Zigarren

Pfeife

Sonstiges

Sonstiges zum Rauchverhalten (optional)

falls Raucher: das letzte Mal vor Probenahme geraucht um

Uhrzeit der letzten Nahrungsmittelaufnahme vor Probenahme (hierzu zählen auch Cola, Säfte...)

Uhrzeit der ersten Probenahme

Atemprobevolumen erstes Röhrchen [Liter]

Atemprobevolumen zweites Röhrchen [Liter]

Probenahme Gasmaus ist erfolgt (ja/nein) ☐

Anamnese (bei mehreren Nebendiagnosen einer Erkrankung bitte nur die führende Erkrankung angeben)

Begleiterkrankungen vorhanden: Ja ☐ Nein ☐

pulmonale Begleiterkrankungen: Ja ☐ Nein ☐
falls pulmonal "ja" bitte spezifizieren:

COPD: ☒ I ☐ II ☐ III ☐ IV

Emphysem: Ja ☐ Nein ☐

Interstitielle Lungenerkrankung: Ja ☐ Nein ☐
wenn ja, welche:

pulmonale Vor-OP: Ja ☐ Nein ☐
wenn ja, welche:

onkologische Erkrankungen: Ja ☐ Nein ☐
wenn ja, welche:

Diabetes: Ja ☐ Nein ☐
wenn ja, welche:

Nierenerkrankungen: Ja ☐ Nein ☐
wenn ja, welche:

Herzkrankungen: Ja ☐ Nein ☐
wenn ja, welche:

sonstige Begleiterkrankungen: Ja ☐ Nein ☐
wenn ja, welche:

Anhang Abbildung 19: Erhebungsbogen für Patienten

Visite 2 - OP

Medikamenteneinnahme: ☐ Ja ☐ Nein

wenn ja, welche:

Analgetika: ☐ Ja ☐ Nein

wenn ja, welche:

Antibiotika: ☐ Ja ☐ Nein

wenn ja, welche:

Antikoagulation: ☐ Ja ☐ Nein

wenn ja, welche:

Immunsuppression: ☐ Ja ☐ Nein

(z.B. Decortin, MTX, Cyclophosphamid)

wenn ja, welche:

inhalative Kortikoide: ☐ Ja ☐ Nein

wenn ja, welche:

andere Medikamente: ☐ Ja ☐ Nein

wenn ja, welche:

präoperatives cT-Stadium: ☒ cT1a ☐ cT1b ☐ cT2a ☐ cT2b ☐ cT3 ☐ cT4 ☐

präoperatives cN-Stadium: ☒ cN0 ☐ cN1 ☐ cN2 ☐ cN3 ☐

präoperatives cM-Stadium: ☒ cM0 ☐ cM1a ☐ cM1b ☐

präoperative Stadieneinteilung: ☒ Ia ☐ Ib ☐ IIa ☐ IIb ☐ IIIa ☐ IIIb ☐ IV ☐

Datum der OP (dd.mm.yyyy):

OP-Verfahren

☐ atypische Resektion

☐ Lobektomie

☐ Bilobektomie

☐ Segmentresektomie

☐ Pneumonektomie

☐ sonstige

und zwar:

Lymphadenektomie (LAD) ☐ Ja ☐ Nein

Biopsie aus OP-Präparat erhalten ☐ Ja ☐ Nein

Tumorprobe in g:

Normalgewebe in g:

Anhang Abbildung 19 (Fortsetzung): Erhebungsbogen für Patienten

Visite 3 - stationärer Aufenthalt

präoperative Vitalkapazität Lunge (vc in ist)

präoperative Vitalkapazität Lunge (FEV1 ist)

präoperative Diagnose

gesichertes Lungenkarzinom ☐

nicht-gesichertes Lungenkarzinom ☐

sonstige ☐

und zwar:

Gesamtkomplikationen, postoperativ:

keine ☐ lokal ☐ allgemein ☐ beides ☐

postoperative Diagnose:

benigne ☐ maligne ☐

postoperative Histologie

☐ Adeno-Karzinom ☐ Plattenepithel-Karzinom

☐ großzelliges Karzinom ☐ kleinzelliges Karzinom

☐ neuroendokrin ☐ sonstiges

und zwar:

postoperatives T-Stadium: ☒ T1a ☐ T1b ☐ T2a ☐ T2b ☐ T3 ☐ T4 ☐

postoperatives N-Stadium: ☒ N0 ☐ N1 ☐ N2 ☐ N3 ☐

postoperatives M-Stadium: ☒ M0 ☐ M1a ☐ M1b ☐

postoperative Stadieneinteilung: ☒ Ia ☐ Ib ☐ IIa ☐ IIb ☐ IIIa ☐ IIIb ☐ IV ☐

Visite 4 - Nachsorge

Datum der Probenahme:

Kommentar zum Patienten (optional)

falls Raucher: das letzte Mal vor Probenahme geraucht um

Uhrzeit der letzten Nahrungsmittelaufnahme vor Probenahme (hierzu zählen auch Cola, Säfte...)

Uhrzeit der ersten Probenahme

Atemprobenvolumen erstes Röhrchen [Liter] Probenahme Gasmaus ist erfolgt (ja/nein) ☐

Atemprobenvolumen zweites Röhrchen [Liter]

Kommentar zur Probenahme (optional)

Anhang Abbildung 19 (Fortsetzung): Erhebungsbogen für Patienten



Charité
Charitisches Hospital Berlin | CHZ



Evangelische Lungenklinik Berlin
Ein Unternehmen der Paul Gerhardt Kliniken



BAM
Bundesanstalt für
Arbeitsmedizin
und -prüfung

Erhebungsbogen BIOAIR-Studie Proband

Datum der Probenahme:

Visite durchgeführt durch (Kurz):

Probandencode (siehe Koffer):

Alter des Probanden: Geschlecht:

Größe in cm: Gewicht in kg:

Kommentar zum Probanden (optional):

Rauchverhalten:

Rauchen beendet seit (MM.JJJJ):

Packyears:

Was haben Sie geraucht?
Mehrfachauswahl durch "Tab" + Mausclick

Zigaretten

Zigarren

Pfeife

Sonstiges

Sonstiges zum Rauchverhalten (optional):

falls Raucher: das letzte Mal vor Probenahme geraucht um

Uhrzeit der letzten Nahrungsmittelaufnahme vor Probenahme
(hierzu zählen auch Cola, Säfte...):

Uhrzeit der ersten Probenahme

Kommentar zur Probenahme (optional):

Anamnese (bei mehreren Neben Diagnosen einer Erkrankung bitte nur die führende Erkrankung angeben)

Lungenerkrankung: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Krebserkrankungen: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Diabetes: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Nierenerkrankungen: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Herzkrankungen: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

sonstige Begleiterkrankungen: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Medikamenteneinnahme: Nein ☐ Ja ☐

Analgetika: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Antibiotika: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Antikoagulation: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Immunsuppression:
(z.B. Decortin, MTX, Cyclophosphamid): Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

inhalative Kortikosteroide: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

andere Medikamente: Nein ☐ Ja ☐ wenn ja, welche:

Anhang Abbildung 20: Erhebungsbogen für gesunde Probanden